UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie
Année 1962 N° 23

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES LIPIDES GLOBULAIRES DE L'HOMME

Travail du Laboratoire de Chimie Biologique (Professeur B. Valdiguié)
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

présentée et soutenue publiquement en octobre 1962

par

Georges SOULA
Pharmacien
Assistant de Biochimie

Membres du Jury

MM. P. VALDIGUIÉ	:	*Président*
P. BOURBON	:	*Assesseurs*
L. DOUSTE-BLAZY	:	»
A. BRU	:	»
PITET	:	*Suppléant*

ALBI
IMPRIMERIE COOPÉRATIVE DU SUD-OUEST

SOULA (Georges)

Contribution à l'Etude des lipides globulaires humains

ALBI - Imprimerie Coopérative du Sud-Ouest, 1962, in-8° - 170 pages.

Thèse de Pharmacie, Toulouse N° 23.

SOULA (Georges)

Contribution à l'Etude des lipides globulaires humains

ALBI - Imprimerie Coopérative du Sud-Ouest, 1962, in-8° - 170 pages.

Thèse de Pharmacie, Toulouse N° 23.

SOULA (Georges)

Contribution à l'Etude des lipides globulaires humains

ALBI - Imprimerie Coopérative du Sud-Ouest, 1962, in-8° - 170 pages.

Thèse de Pharmacie, Toulouse N° 23.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546525_0051

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DES

LIPIDES GLOBULAIRES DE L'HOMME

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie
Année 1962 N° 23

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES LIPIDES GLOBULAIRES DE L'HOMME

Travail du Laboratoire de Chimie Biologique (Professeur P. Valdiguié)
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

présentée et soutenue publiquement en octobre 1962

par

Georges SOULA
Pharmacien assistant de Biochimie

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Membres du Jury

MM. P. VALDIGUIÉ	:	*Président*
P. BOURBON	:	*Assesseurs*
L. DOUSTE-BLAZY	:	»
A. BRU	:	»
PITET	:	*Suppléant*

ALBI
IMPRIMERIE COOPÉRATIVE DU SUD-OUEST

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ de MÉDECINE et de PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

Doyen : M. LAZORTHES

Premier assesseur : M. BLANC

Deuxième assesseur : N...

Doyens honoraires : MM. GORSE, CALVET, LEFEBVRE, BRUSTIER

Professeurs honoraires : MM. RIBAUT, VALLOIS, CLERMONT, NANTA, DUCUING, TAPIÉ, DELAS, RISER, SOULA

SECTION MÉDECINE

Professeurs

Clinique médicale	M. MÉRIEL
Clinique médicale	M. GADRAT
Clinique chirurgicale et gynécologique	M. FABRE Pierre
Clinique chirurgicale et du cancer	M. GRIMOUD
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	M. VIRENQUE
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	M. BAZEX
Clinique des maladies de la tuberculose et pathologie interne	M. MOREL
Clinique des maladies des voies urinaires	M. LHEZ
Clinique médicale infantile et puériculture	M. SOREL
Clinique neurologique et psychiâtrique	M. GÉRAUD
Clinique obstétricale	M. GUILHEM
Clinique odonto-stomatologique	M. N...
Clinique ophtalmologique	M. CALMETTES
Clinique ORL et chirurgie maxillo-faciale	M. CALVET
Clinique rhumatologique	M. RUFFIÉ René
Clinique traumatologique des membres	M. RIEUNAU
Accouchement et obstétrique sociale	M. PONTONNIER
Anatomie	M. LAZORTHES
Anatomie appliquée	M. POULHÈS
Anatomie pathologique	M. FABRE Jacques
Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale	M. ANDRIEU
Chimie biologique	M. VALDIGUIÉ
Electro-radiologie	M. MARQUÈS
Embryologie générale	M. BROUSSY Jean
Histologie	M. BIMES
Hydrologie thérapeutique et climatologie	M. DARNAUD
Médecine légale et médecine du travail	M. PLANQUES
Médecine sociale	M. BONHOURE
Parasitologie	M. BOUISSET
Pathologie chirurgicale	M. DAMBRIN
Pathologie générale et médecine expérimentale	M. SENDRAIL
Physico-chimie	M. AUVERGNAT

Physiologie	M. LAPORTE Yves
Physiologie appliquée et pharmacologie	M. BAISSET
Physique biologique et médicale	M. BUGNARD
Propédeutique médicale	M. N...
Thérapeutique	M. DARDENNE

Professeurs à titre personnel

Anatomie générale et comparée	M. COULOUMA
Pathologie médicale	M. LAPORTE Jacques
Bactériologie	Mme ENJALBERT

Professeurs sans chaire

Biochimie médicale	M. DOUSTE-BLAZY
Physique médicale	M. BRU

Maitres de conférences agrégés

Anatomie	M. BASTIDE
Anatomie pathologique	M. BOUISSOU
Anesthésiologie	M. LARENG
Carcinologie	M. ESTRADE
Histologie et embryologie	M. PLANEL
Parasitologie	M. RUFFIÉ Jacques
Pathologie expérimentale	M. GLEIZES
Physiologie	M. MONTASTRUC
Physiologie	M. BESSOU
Physique médicale	M. COMMANAY

Agrégés

Médecine générale	M. MONNIER
»	M. RIBAUT
»	M. DELAUDE
»	M. CALAZEL
»	M. RASCOL
Chirurgie générale	M. ENJALBERT
»	M. FICAT
»	M. PASQUIÉ
»	M. SOUQUET
»	M. SARRAZIN
Dermatologie et syphiligraphie	M. DUPRÉ
Hydrologie	M. DENARD
Médecine légale	M. GRÈZES-RUEFF
Obstétrique	M. ESPAGNO
Odontostomatologie	M. CADENAT Henri
Pédiatrie	M. BARDIER

Agrégés libres

Anatomie	M. THOMAS
Ophtalmologie	M. DÉODATI
O R L	M. CLAUX
Pathologie chirurgicale	M. DIEULAFÉ

SECTION PHARMACIE

Professeurs

Botanique et cryptogamie	Mme DULUCQ-MATHOU
Chimie analytique, toxicologie et hygiène industrielle	M. BOURBON
Chimie pharmaceutique	M. BLANC
Matière médicale	M. VINCENT
Pharmacie chimique et pharmacodynamie	M. CAUJOLLE
Pharmacie galénique	M. STANISLAS
Zoologie	M. ROUX

Professeurs à titre personnel

Pharmacie	M. COUTURIER

Professeurs sans chaire

Sciences naturelles	Mme CAUJOLLE

Maîtres de conférences agrégés

Microbiologie	M. BREUILLAUD
Sciences physiques	M. PITET
Toxicologie	M. BROUSSY Georges

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire principal : M. ROCHE

Secrétaire : M. BERRUT

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par tes candidats (Délibération en date du 12 mai 1891.)

Ce travail est dédié :

A mes grands-parents,

A mes parents et à mes beaux-parents,

A ma femme,

A mon fils Pierre,

A ma famille toute entière en gage de mon très grand amour.

A notre Président de thèse :

Monsieur le Professeur P. VALDIGUIÉ,

Professeur de Chimie Biologique

A notre Jury de thèse :

Monsieur le Professeur L. DOUSTE-BLAZY,

Professeur de Chimie Biologique

Monsieur le Professeur P. BOURBON,

Professeur de Chimie analytique

Monsieur le Professeur A. BRU,

Professeur de Physique Médicale

A nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie de Toulouse.

A nos Maîtres de la Faculté des Sciences de Toulouse.

A nos camarades du Laboratoire de Biochimie
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Toulouse.

AVANT-PROPOS

L'aboutissement de ce travail nous donne l'occasion de témoigner notre respectueuse gratitude à notre Jury de thèse et nos sentiments de vive reconnaissance aux Maîtres dont nous avons reçu l'enseignement.

Nous étions étudiant en pharmacie lorsque nous avons eu l'honneur d'être admis dans le service de Biochimie de la Faculté.

M. le Professeur VALDIGUIÉ nous réserva un accueil qui fut d'emblée cordial et durant notre monitorat il ne cessa, toujours avec la plus grande gentillesse, de nous prodiguer ses judicieux conseils.

Par la suite, il nous accorda sa plus grande confiance dans l'élaboration de ce travail et en nous déléguant les délicates fonctions de chef de travaux.

Ses conseils, sa sympathie à notre égard, furent pour nous une aide précieuse dans l'accomplissement de cette double tâche.

Nous le remercions bien vivement de la cordialité qu'il nous a sans cesse témoignée.

Nous aimerions que cette modeste contribution, qu'il a toujours suivie avec grand intérêt et à laquelle il a très souvent participé, soit l'expression de notre grande reconnaissance et de notre respectueux attachement.

Une grande part de notre reconnaissance s'adresse aussi à M. le Professeur L. DOUSTE-BLAZY. Nous avons toujours été très touché de son attachement à notre égard.

Nous lui devons nos connaissances biochimiques et nous sommes reconnaissant des contacts productifs que nous avons avec lui.

Sa présence à nos côtés, ses sages conseils sont pour nous une aide précieuse dans nos fonctions de chef de travaux. Ce travail est en grande partie son œuvre ; il nous l'a inspiré, il a suivi pas à pas son évolution, il a su nous encourager à suivre telle voie ou à abandonner telle autre.

Son sens de la recherche, sa rigueur scientifique, sa cordiale sympathie sont pour nous, à tous les instants, le meilleur réconfort.

Ce travail est pour nous l'occasion de lui affirmer notre très vive reconnaissance et notre plus cordial attachement.

M. le Professeur P. Bourbon, professeur de Chimie Analytique et de Toxicologie, nous a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail ; nous l'en remercions très sincèrement.

Qu'il soit assuré de notre déférente gratitude et accepte nos sentiments très respectueux.

M. le Professeur A. Bru, Professeur de Physique médicale, a su nous accorder sa plus grande sympathie.

Nous le remercions d'avoir accepté d'être notre juge.

Nos sentiments de reconnaissance vont également à tous nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie.

Nous remercions aussi tous nos Maîtres de la Faculté des Sciences dont nous avons apprécié l'enseignement rigoureux et les meilleurs sentiments à notre égard.

Il nous est agréable de remercier Pierre Valdiguié pour les multiples encouragements qu'il nous a prodigués et pour la solide amitié, déjà ancienne, qu'il ne cesse de nous manifester.

Nous remercions également tous nos camarades du Service de Biochimie qui nous ont toujours témoigné leur plus vive sympathie.

PLAN

Introduction

I. TRAVAUX ANTERIEURS

Le Stroma globulaire

- **Constitution**
  - I. Chimique :
    1. Lipides,
    2. Protéines,
    3. Enzymes,
    4. Glucides.
  - II. Physique.

- **Propriétés**
  - I. Perméabilité et pénétration des substances,
  - II. Propriétés électrophorétiques.

- **Métabolisme des lipides globulaires**
  - I. Physiologique :
    1. Biosynthèse des acides gras,
    2. Biosynthèse du cholestérol,
    3. Biosynthèse des phospholipides,
    4. Échange des lipides entre hématies et plasma
  - II. Pathologique :
    1. Sphérocytose,
    2. Sicklanémie,
    3. Acanthocytose.

- **Rôle des lipides globulaires**
  - I. Propriétés immunochimiques,
  - II. Rôle dans l'hémolyse,
  - III. Rôle dans le transport des ions.

II. RECHERCHES PERSONNELLES

● Méthodes d'analyse

1. **Méthodes d'extraction des lipides.**
2. **Purification des extraits lipidiques :**
   - A. Dialyse et électrodialyse.
   - B. Purification selon Folch.
3. **Méthodes d'analyse proprement dites**
   - A. Physiques :
     - a. Isolement des lipides :
       1. Par l'acétone.
       2. Sur colonne d'acide silicique.
     - b. Différentes méthodes utilisées :
       1. Chromatographie sur papier à contre courant.
       2. Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique.
       3. Chromatographie sur colonne :
          - Fractionnement des phospholipides.
          - Fractionnement des lipides non phosphorés.
          - Séparation du cholestérol et des esters.
       4. Distribution à contre-courant.
       5. Électrophorèse sur papier.
       6. Spectographie infra-rouge.
   - B. Chimiques :
     1. Dosage du phosphore.
     2. Dosage des esters d'acides gras.
     3. Dosage du cholestérol.
     4. Détermination de l'indice d'iode.
     5. Dosage des acétal phosphatides.
     6. Dosages des bases azotées.

● Résultats

Hématies normales

I. Chromatographie sur papier à contre-courant :
   1. Préparation de l'extrait.
   2. Chromatographie de l'extrait lipidique total.
   3. Chromatographie de l'extrait acétonique
   4. Chromatographie de l'insoluble acétonique.

II. Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique:
    1. Lipides totaux,
    2. Lipides non phosphorés.

III. Chromatographie sur colonne d'acide silicique :
    1. Phospholipides,
    2. Lipides non phosphorés.

IV. Chromatographie sur colonne d'alumine.

V. Distribution à contre-courant.

VI. Électrophorèse des lipoprotéines globulaires.

VII. Lipides globulaires au cours de l'hémolyse successive « in vitro ».

Hématies falciformes

I. Dosages chimiques,

II. Électrophorèse des stromas,

III. Chromatographie des éluats d'électrophorèse,

IV. Chromatographie sur colonne d'acide silicique.

Conclusion

INTRODUCTION

Jusqu'à ces dernières années, les études concernant les hématies ont surtout porté sur leur contenu et sur le rôle qu'elles jouaient, grâce à l'hémoglobine, dans les phénomènes respiratoires.

Malgré sa spécialisation respiratoire, l'hématie doit avoir, comme toute cellule de l'organisme, un métabolisme propre et elle doit réaliser des échanges avec le milieu qui l'environne.

L'énergie nécessaire au maintien du fer bivalent, qui seul permet le transport de l'oxygène, avait été attribuée à une glycolyse anaérobie.

A côté de cette fonction respiratoire, divers auteurs, dont CARTIER et LEROUX (44), *reconnurent à l'hématie des besoins énergétiques pour les échanges de gaz et de cations avec le plasma et dès lors la notion d'un métabolisme de l'hématie put être envisagée ; celle-ci ne fut plus considérée seulement comme un fragment inerte de cytoplasme ou comme un « sac d'hémoglobine ».*

Notre connaissance de ce métabolisme globulaire est cependant partielle et fragmentaire. Délaissant le rôle de l'hémoglobine, il nous a paru utile d'envisager à propos du métabolisme des globules rouges :

- *— leur constitution et en particulier leur constitution lipidique,*
- *— leur membrane,*
- *— et le rôle des lipides dans les échanges de l'hématie.*

Ce sont ces points principaux que nous avons abordés dans ce travail inaugural.

I. - TRAVAUX ANTÉRIEURS

L'Hématie, vecteur d'hémoglobine et cellule vivante

Les données actuelles permettent de considérer l'hématie de deux manières : elle est un vecteur d'hémoglobine et une cellule vivante.

Comme nous venons de l'indiquer nous n'envisagerons pas la présence et les propriétés de l'hémoglobine ; nous ne considèrerons que les constituants non hémoglobiniques du globule rouge et leur support : le stroma des histologistes.

L'étude de ce stroma peut être faite par des moyens chimiques et des moyens physiques.

Le Stroma globulaire

I. — CONSTITUTION CHIMIQUE.

Nous serons amenés à définir le globule rouge avec PONDER, comme une « surface à l'ultrastructure protéique et lipidique hautement orientée, entourant de l'hémoglobine qui possèderait une orientation un peu plus définie qu'une solution ».

L'enveloppe globulaire est constituée, comme l'ont montré BALLENTINE et PARPART (13) par des protéines et des lipides, ces molécules étant entre elles fortement liées.

La composition chimique des hématies est résumée dans le tableau suivant :

COMPOSITION CHIMIQUE DES HEMATIES

[Cazal (44 *bis*), Erythrocytes et Erythropathies] :

Hématies = 100 ml.

Résidu sec	= 39 g.
Hémoglobine	= 36 g.
Autres substances solubles	= 1,67 g.
Substances solubles (stromas sans hémoglobine)	= 1,33 g.

Stromas de 10 ml d'hématies = 1,33 g.

Lipides	= 0,47 g.
Protéines	= 0,86 g.

Nous envisagerons les données actuelles concernant divers constituants de l'hématie : lipides, protéines, enzymes et glucides.

1. - Les lipides.

L'étude des lipides globulaires a été envisagée très tôt.

En 1880 déjà, Hoppe-Seyler (120) déterminait leur valeur. Pastucci (210) indiquait le taux des lécithines et du cholestérol.

Utilisant leurs différences de solubilité, Kirk (139) séparait, pour les doser, les glycérophosphatides des sphingomyélines par insolubilisation de ces dernières dans l'éther de pétrole.

Les lipides sont dosés soit sur les hématies, soit sur leurs stromas. Dans la première éventualité, l'extraction est réalisée par des solvants organiques. Dans le second cas, l'estimation des lipides est faite après hémolyse ; cette méthode nous paraît moins valable du fait de l'altération des parois cellulaires au cours de l'hémolyse.

C'est sans doute une des raisons pour lesquelles les valeurs attribuées aux lipides globulaires ont parfois varié dans d'assez larges proportions. Nous pensons aussi que ces variations peuvent être imputées à des modes d'extraction, à des techniques de fractionnement et à des moyens d'étude différents.

De nombreuses causes peuvent intervenir pour modifier les propriétés des lipides. Polonovski (245) a mon-

tré que les acides aminés liés aux lipides des hématies pouvaient modifier, dans une large mesure, les propriétés de solubilité des phospholipides.

On avait, en effet, proposé des valeurs très éloignées les unes des autres, c'était le cas des résultats de Boyd (31) et de Kirk (140)

Alors que Kirk (140) estimait les lécithines et les céphalines respectivement à 16 et 60 % des phospholipides totaux, plus récemment pour Formijne (86) ces lipides représentent 41 et 31 %.

Des méthodes d'étude récentes, en particulier la chromatographie sur acide silicique et la chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique, ont permis une connaissance plus exacte des lipides globulaires.

Les hématies humaines renferment 400 mg de lipides totaux pour 100 ml. Ce taux semble généralement admis, bien que Reed et Marinetti (243) aient avancé un chiffre de 495 mg.

Les valeurs respectives des divers lipides sont résumées dans le tableau 1.

TABLEAU 1

COMPOSITION DES LIPIDES DU SANG HUMAIN
(en % des lipides totaux)

	Plasma	*Hématies*
Triglycérides	9	3
Diglycérides	0,5	3
Monoglycérides	0,5	3
Lécithines	24	19
Cholestérol total	35	25
Cholestérol estérifié	25	0
Cholestérol libre	10	25
Phospholipides totaux	32	55
Céphalines	0 à 2	19
Sphingomyélines	3	15
Lysocithines	3	2
Glucolipides		11

A un taux inférieur de moitié par rapport à celui du plasma, ces lipides se répartissent en trois groupes essentiels que nous envisagerons séparément. Parmi eux on rencontre :

— des phospholipides, représentant 50 à 60 % de la totalité des lipides ;
— des acides gras libres et des graisses neutres : glycérides et cholestérol, formant 35 % des lipides totaux ;
— des glucolipides (10 à 12 %).

Les Phospholipides

Plus abondants dans les hématies que dans le plasma, ils représentent un peu plus de la moitié des lipides totaux. Ils sont surtout constitués par des lécithines, des sphingomyélines, des céphalines et des lysocithines. Dans la littérature les taux des divers phospholipides varient un peu d'une expérimentation à l'autre et nous pensons que ces différences tiennent essentiellement aux méthodes d'analyses et à l'état de pureté des lipides étudiés.

La plupart des auteurs s'accordent à reconnaître pour le phosphore lipidique des valeurs allant de 4,30 à 4,60 mg par litre d'hématies.

Le tableau 2 représente la teneur en phospholipides des hématies de diverses espèces animales, exprimée en pourcentage des phospholipides totaux (92).

TABLEAU 2

PHOSPHOLIPIDES DES HEMATIES DE QUELQUES ESPECES ANIMALES

	Lécithines	*Sphingomyéline et lysophosphatides*	*Céphalines*	*Phosphatides faiblement liés*
Homme . . .	38,5	36,5	25	21,5
Rat	59	26	15	19
Lapin	44	29	27	26
Cochon . . .	28,5	36,5	35	15
Bœuf.	6	61	33	6
Mouton . . .	1	64	35	11

Lécithines.

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, les lécithines ne sont pas présentes dans les hématies de tous les animaux et leur teneur varie dans de très larges proportions.

Turner (273, 274), signalant l'absence ou la très faible teneur en lécithines des globules rouges de ruminants, attire l'attention sur l'existence d'une relation possible entre la teneur en lécithines de certains animaux et la sensibilité relative de leurs globules rouges aux hémolysines des venins de serpents.

Selon Dawson (57), les lécithines seraient trois fois plus abondantes chez la plupart des mammifères que chez les ruminants. La proportion des sphingomyélines serait au contraire bien plus élevée chez les seconds de sorte que les phospholipides à choline varieraient peu chez les mammifères.

Les lécithines chez l'homme représentent 38,5 % des phospholipides totaux.

Hanahan, Watts et Pappajohn (105) ont montré qu'à l'opposé de l'homme, chez qui les lécithines prédominent, le bœuf possède surtout des sphingomyélines qui représenteraient 95 % des phospholipides choliniques.

Pour ces deux espèces le pourcentage de phospholipides à choline est toujours de 55 à 60.

Dans le tableau 3 nous résumons les taux des divers phosphatides globulaires tels qu'ils ont été donnés par quelques auteurs.

TABLEAU 3

VALEURS ATTRIBUEES PAR QUELQUES AUTEURS AUX PHOSPHOLIPIDES GLOBULAIRES HUMAINS

	Turner (273-274)	Phillips (217)	Dawson (57)	Reed et Marinetti (243)	Axelrod (10)	Hanahan (105)	De Gier (92 bis)
Lécithines.	28	32,9	30,3		33		39
Lysocithines		1,9		2,5	2		3
Sphingomyélines . .	28	22,8	19,3	22	23		37
Phosphatidyl-éthanolamines . .	43	42,5	28,2	24,6	28	30	24
Phosphatidyl-sérines.				14,9	15	20	
Inositol-phosphatides. . .			1,4		4	8	
Acétal-phosphatides. . .			9,1				
Acides phosphatidiques .			1,7	4			
Polyglycérol-phosphatides. . .				2		1	

Sphingomyélines et céphalines.

Alors que la plupart des auteurs s'accordent pour reconnaître aux sphingomyélines des valeurs d'un peu plus du quart des phospholipides, les taux indiqués pour les céphalines varient dans des proportions plus larges.

Elles représenteraient les phospholipides les plus abondants.

Quoiqu'il en soit, elles sont en bien plus grande proportion que dans le plasma.

Elles existeraient, en partie au moins, sous forme de plasmalogènes.

Dawson (57), signalant dans les diverses espèces animales, des teneurs en phosphatidylsérines allant de 9 à 16 %, remarque par contre que les phosphatidyléthanolamines sont plus abondantes chez les omnivores que chez les herbivores.

Selon Hanahan (105), les céphalines globulaires de l'homme renfermeraient une forte proportion d'acides gras insaturés, à l'inverse des lécithines et sphingomyélines, qui possèdent surtout des acides gras saturés.

Les céphalines varieraient selon les espèces, signalent également de Gier et Van Deenen (92 bis).

Il y aurait également une proportionnalité entre lécithines d'une part, sphingomyélines et céphalines d'autre part.

Ainsi les hématies de mouton pauvres en lécithines sont très riches en sphingomyélines. La diminution des lécithines dans une espèce est accompagnée d'une augmentation des sphingomyélines et des céphalines.

Les variations des céphalines dans les diverses appréciations peuvent être expliquées peut-être par leur fragilité.

De Gier (92) a montré en effet que lorsque les extraits lipidiques secs sont conservés sous vide, même à + 4° et en présence d'anhydride phosphorique, on observe une diminution des céphalines qui auraient tendance à se transformer en lysodérivés.

Le choix de la substance anticoagulante utilisée pour le prélèvement aurait, selon Hanahan (105), une grande importance. En effet, l'héparine semble favoriser à partir des phosphatidyléthanolamines la formation de lysodérivés correspondants.

Tout récemment Matsumoto (195) a rapporté les teneurs en glycérophosphatides des stromas globulaires humains isolés puis fractionnés sur acide silicique.

En pourcentage des glycérophosphatides totaux, il attribue aux :

céphalines.	29 %
lysocéphalines.	17,5 %
lécithines.	20,5 %
lysocithines.	23 %

Ces valeurs nous paraissent assez élevées pour les divers lysolipides.

Autres phosphatides.

A côté des lécithines, sphingomyélines et céphalines, on rencontre aussi parmi les phospholipides globulaires des lysocithines, des lysocéphalines, des acides phosphatidiques et des inositolphosphatides mais en proportion moins importante.

Les lysocithines n'excèdent pas 2 à 3 % des phospholipides totaux.

Les inositolphosphatides représenteraient tout au plus 4 à 5 %. Cette fraction renfermerait surtout de l'acide stéarique. DITTMER et HANAHAN (64) avaient signalé l'existence d'une fraction d'inositolphosphatide riche en acides gras saturés et particulièrement en acide stéarique dans des préparations de tissu hépatique.

On accorde en général aux phosphatides une composition bien déterminée en certains types d'acides gras. Il est possible que leur constitution en acides gras détermine des propriétés de perméabilité des membranes globulaires puisque l'on note des propriétés différentes, selon les espèces, concordant avec des répartitions variables des acides gras unis aux phosphatides.

Les acides phosphatidiques sont des composés mineurs des hématies, leur rôle n'en est pas moins fondamental.

Les Glycérides

Les glycérides globulaires ont été peu étudiés. Ils existent sous la forme de mono, di et triesters.

VACCA (276), dans une étude comparative des glycérides plasmatiques et globulaires chez l'homme, montre qu'à l'inverse du plasma où les triglycérides prédominent, l'hématie renferme des quantités quasi équivalentes de mono, di et triglycérides avec une quantité sensiblement plus faible de monoglycérides. Leur teneur globale n'excède pas 10 % de la totalité des lipides. Les triglycérides renfermeraient surtout des acides gras saturés, leur indice d'iode est faible (5 à 10).

Les acides gras

Les acides gras libres sont peu abondants dans l'hématie : 0,5 % des lipides neutres. La composition globale en acides gras des globules rouges est mieux connue depuis l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse.

Comparant les acides gras globulaires de diverses espèces animales, JAMES et LOVELOCK (124), ont montré la prédominance d'acide stéarique, d'acide palmitique et d'acide oléique. Ils représentent chez l'homme la presque totalité des acides gras présents.

Il faut remarquer la faible teneur en acides gras polyinsaturés.

La figure 4 montre les valeurs des divers acides gras des hématies de l'homme, selon JAMES et LOVELOCK (124).

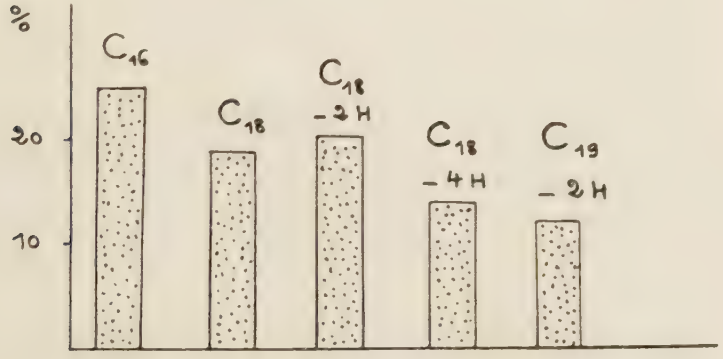

Figure 4

Composition en acides gras des hématies humaines selon JAMES et LOVELOCK (124)

Acide palmitique	19,8	à 25	%
Acide stéarique	13,5	à 18	%
C_{16} à 1 double liaison	0,65	à 1,47	%
C_{18} à 1 double liaison	19	à 21,6	%
C_{19} à 1 double liaison	10,5	à 15,2	%
C_{18} à 2 doubles liaisons	10,3	à 14,6	%
C_{20} à nombreuses doubles liaisons....	19,8	à 4,8	%

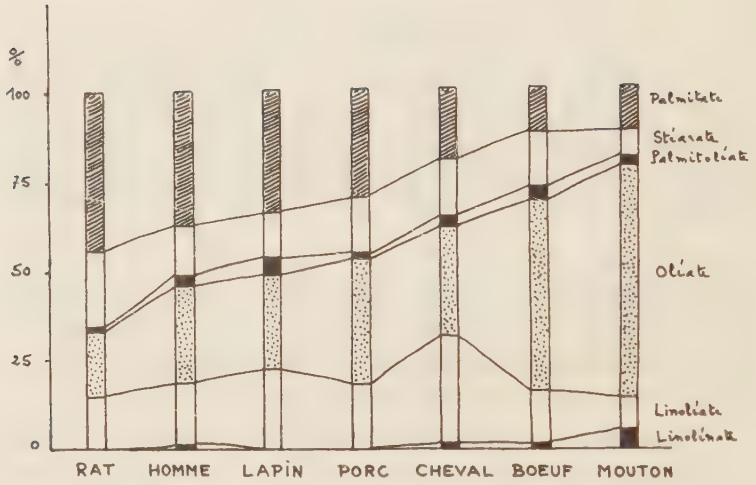

Figure 5

Pourcentages en acides gras
des lipides des stromas de globules rouges de quelques espèces animales selon KOGL, DE GIER, MULDER et VAN DEENEN (149).

Le diagramme 5 illustre les proportions entre les divers acides gras présents.

KOGL (149) a étudié par chromatographie en phase gazeuse la constitution en acides gras des membranes globulaires de divers animaux. L'essentiel des différences de composition chez les diverses espèces étudiées porte surtout sur l'acide palmitique et l'acide oléique. Ceci est illustré dans le schéma n° 5.

Ces mêmes auteurs montrent une diminution du rapport acide palmitique/acide oléique lorsque l'on passe du rat à l'homme, au lapin, au porc, au cheval, au bœuf et enfin au mouton.

Le tableau ci-contre résume les teneurs en acides gras des stromas d'hématies humaines, selon KOGL (149). Ces résultats diffèrent un peu de ceux donnés par JAMES et LOVELOCK (124).

Acide palmitique.	37,5
Acide stéarique	15,5
Acide oléique	26,5
Acide linoléique	17,0
Acide linolénique	2,0

La composition en acides gras des membranes globulaires est une caractéristique constante d'une espèce. Il n'y a pas de variation en fonction des saisons ou de l'alimentation ; par contre d'une espèce à l'autre la composition en acides gras varie notablement.

James et Lovelock (124) ont mis l'accent sur la relation possible entre la composition des membranes en acides gras et leur perméabilité. Leur teneur en acide oléique possède une correspondance avec le temps d'hémolyse des globules rouges placés dans une solution isotonique de glycérol, ainsi que l'ont montré Jacobs, Glassman et Parpart (122-123).

Le Cholestérol

Parmi les lipides neutres des globules rouges humains, le cholestérol a une place importante. Il représente, selon Douste-Blazy (69 bis, 71) de 20 à 30 % des lipides totaux et de 75 à 90 % des lipides non phosphorés.

La valeur de 176 mg pour 100 ml indiquée par Harris (108) semble un peu élevée. A la suite de Brun (36), de Marinetti (243) et de Munn (205), il semble bien que le cholestérol globulaire soit compris entre 135 et 140 mg pour 100 ml. d'hématies.

Reste à connaître l'état du cholestérol. En effet, la présence de cholestérol estérifié évaluée par Erickson (79) à 16 % du cholestérol total, a été fortement discutée.

Plus récemment Formijne (86) indique l'absence de stérides. Brun (36), Marinetti (243) et Munn (205) ont aussi affirmé que la totalité du cholestérol se trouvait à l'état libre.

Nous-mêmes, après distribution à contre-courant, n'avons pas décelé d'esters de cholestérol et montré que la totalité du cholestérol se trouvait à l'état libre.

Hanahan (105) estime à peine à 1 % du cholestérol total une petite fraction d'esters.

Des travaux encore plus récents de De Gier et Van Deenen (91), de Maggioni (180), utilisant les techniques

chromatographiques sur alumine selon la méthode de Agneray (1) concluent eux aussi à l'absence de cholestérol estérifié.

Nous avons nous-mêmes appliqué cette dernière méthode; elle nous a montré l'absence de cholestérol estérifié. La totalité du cholestérol globulaire est donc présente sous forme libre.

Plasma et hématies montrent donc une opposition marquée quant à la nature du cholestérol présent. Si les esters de cholestéryle dominent dans le plasma, ils sont absents de l'hématie ; à l'inverse, le cholestérol libre est beaucoup plus abondant dans les globules rouges.

Il nous semble essentiel que la détermination du cholestérol soit effectuée sur le globule rouge et non sur le stroma, les diverses méthodes de préparation entraînant toujours une perte de cholestérol.

Les Glucolipides

Les phospholipides et les lipides non phosphorés, que nous venons d'envisager, ne sont pas les seuls lipides du stroma, une classe particulière : les glucolipides, « lipopolysaccharides » ou mucolipides forment des associations avec les protéines, à côté des lipoprotéines.

La connaissance de ces lipides nous a été révélée par Klenk (145) et par Yamakawa (291) et de nombreux travaux ont montré qu'ils interviennent dans les propriétés immunochimiques de l'hématie.

Ces substances sont difficiles à isoler et à purifier. C'est peut-être pourquoi elles étaient longtemps restées ignorées. Le mérite d'une étude approfondie revient à Yamakawa et à ces collaborateurs.

Les glucolipides représentent de 10 à 12 % des lipides totaux de l'hématie. On a signalé qu'ils ne renfermaient que des acides gras saturés.

Quelle est la nature de ces substances ?

Yamakawa et Iida (293), les premiers, ont attribué aux haptènes globulaires une nature mucolipidique. Leur participation à l'activité des groupes sanguins a été en-

suite confirmée par YAMAKAWA et IRIE (300), puis par HAKOMORI et JEANLOZ (103).

YAMAKAWA et SUZUKI (291) ont attribué aux glucolipides des structures différentes selon leur origine animale.

Ainsi le glucolipide isolé à partir d'hématies de cheval ou « hématoside » est constitué de sphingosine, d'acides gras, d'hexoses et d'acide neuraminique.

KLENK (144) a isolé un glucolipide semblable des hématies humaines contenant de la galactosamine mais pas d'acide neuraminique, c'est le « globoside ».

Ces détails de structure entre l'hématoside et le globoside ont été confirmés par YAMAKAWA et SUSUKI (292 et 294) et par MATSUMOTO (194).

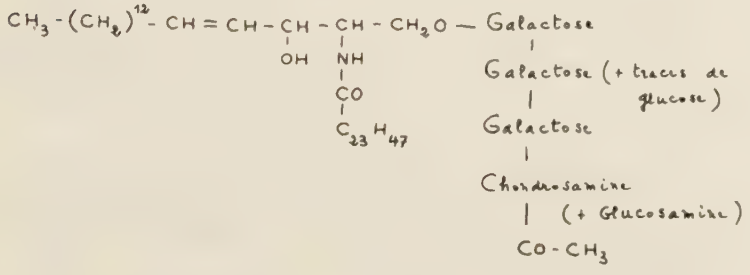

Schéma du globoside humain selon YAMAKAWA (297-298)

YAMAKAWA (297-298) s'est surtout attaché à l'étude du globoside des hématies humaines qu'il a pu séparer des phospholipides par chromatographie sur colonne de florisil, selon un procédé décrit par RADIN (239).

Extrait par le méthanol et l'éther, ce glucolipide a pu être purifié par solubilisation dans différents solvants organiques et cristallisé. Les auteurs ont pu ainsi indiquer ses propriétés de solubilité et montrer qu'il est une substance homogène à l'électrophorèse et qu'il inhibe l'hémagglutination des hématies d'un sang donné par les isoanticorps correspondants. L'un de ces glucolipides purifiés n'est autre que l'haptène de FORSSMAN. C'est encore YAMAKAWA (299) qui, fractionnant le globoside par chromatographie sur colonne d'acide silicique,

a montré qu'il pouvait être scindé en deux fractions actives.

Ce globoside est, en effet, une substance hétérogène, concluent Yamakawa, Irie et Iwanaga (290 et 295). Ces deux fractions ont des propriétés physiques et une composition un peu différentes.

Ainsi les mucolipides de l'homme, du mouton et du lapin, contiennent des acides sialiques.

A partir des stromas d'hématies de chien, Matsumoto (194) a isolé un glucolipide renfermant de la chondrosamine qui est la seule hexosamine présente. Ce glucolipide contient un seul acide gras : l'acide lignocérique, du glucose et du galactose.

Ces mêmes auteurs ont donné des spectres infrarouges des glucolipides de diverses espèces animales.

Il faut enfin signaler un travail récent de Hakomori et Jeanloz (103) qui, isolant les glucolipides de sang humain des groupes A (+) et B (+), les ont purifiés par chromatographie sur alumine, sur gel de silice et sur cellulose, définissant ensuite leurs propriétés et montrant que leur constitution diffère selon le groupe.

Le glucolipide responsable du groupe A (+) contiendrait sphingosine, acide gras, glucose et galactose; celui du groupe B (+) serait constitué de sphingosine, acide gras, glucose et galactosamine.

Ces lipopolysaccharides globulaires, bien mieux connus depuis quelques années, grâce surtout à l'emploi de la chromatographie sur acide silicique, ne rentrent pas dans le cadre de notre étude personnelle.

Les lipides globulaires existent sous une forme liée, ils sont unis soit à des protéines, soit à des protéines et à des glucides. Les associations lipoprotéiques ont une plus grande répartition que les liaisons lipopolysaccharidiques.

2. — Les protéines.

Les protéines globulaires sont assez peu connues. En faible quantité, à côté de la masse importante de l'hémoglobine, elles représenteraient seulement de 7 à 14 % des protéines totales de l'hématie.

Si une petite quantité se trouve à l'intérieur, elles sont pour la plupart localisées dans le stroma globulaire, où elles sont unies à des lipides.

Selon PARPART (211), ce stroma serait constitué par 60 à 70 % de protéines et 30 à 40 % de lipides, qui représenteraient intégralement tous les lipides globulaires.

A l'étude proprement dite des protéines globulaires doivent surtout être rattachés les travaux de CALVIN (201, 40), de MOSKOWITZ (200) et de DANDLIKER (54).

Ces protéines, de natures diverses, seraient représentées, selon CALVIN (201), par une lipoprotéine : la réticuline ou stromine, constituant le plus abondant, par une protéine soufrée, par une globuline et enfin par une albumine.

Cette albumine ne serait autre que la « substance antisphérante » décrite par FURCHGOTT et PONDER (83).

La stromine serait une lipoprotéine à longue chaîne protéique liée à des lipides, les uns solubles dans l'éther, d'autres solubles dans l'alcool.

L'extraction des lipides éthérosolubles laisserait l'élenine qui, après extraction des lipides alcoolosolubles, laisserait à son tour une protéine semblable à celle décrite par JORPES (128) sous le nom de stromatine.

Nous devons aussi à STERN (263) une étude électrophorétique des lipoprotéines globulaires; leur teneur en protéines n'excèderait pas 15 % de la totalité, elles seraient unies à des lipides, surtout des lécithines et du cholestérol.

3. — LES ENZYMES.

L'hématie possède un équipement enzymatique qui n'est pas négligeable. Les mieux connus de ces enzymes règlent :

— le catabolisme des glucides,
— le métabolisme des nucléoprotéines,
— diverses hydrolyses.

Leur localisation n'est pas univoque, ont affirmé CARTIER et LEROUX (44). Alors que les enzymes de la glycolyse et ceux de la voie de DICKENS et WARBURG, sont

dissous dans le milieu intraglobulaire, à l'inverse, les hydrolases et très probablement les enzymes du métabolisme nucléotidique sont surtout liés aux lipoprotéines du stroma.

Le globule rouge possèderait donc deux compartiments métaboliques distincts, caractérisés par des activités enzymatiques différentes : cytoplasme et stroma.

Nous verrons plus loin que la réaction antigène-anticorps, la résistance à l'hémolyse, les phénomènes de transport actif des ions et des électrolytes dépendent de la structure chimique mais aussi du potentiel enzymatique du stroma.

4. — Les glucides.

Comme les enzymes, les glucides globulaires présentent une double topographie. A côté des glucides habituels de tout cytoplasme cellulaire, localisés dans le suc globulaire, l'hématie possède aussi des glucides, et des dérivés des glucides, qui se trouvent unis à des lipides et à des protéines, dans le stroma globulaire.

Nous avons déjà envisagé la constitution de ces glucolipides et lipopolysaccharides, l'étude de leur rôle fera l'objet d'un paragraphe particulier.

II. - CONSTITUTION PHYSIQUE.

L'étude physique a surtout fait des progrès depuis l'utilisation du microscope électronique et depuis que de nombreux problèmes de transfusion sanguine se sont posés.

Les données infrastructurales sur les éléments sanguins sont restées réduites tant que ces cellules n'ont pu être étudiées que sur des frottis, par moulage ou par ombrage.

Les premières études de microscopie électronique nous ont apporté des documents intéressants, bien que limités, sur les états de surface des hématies.

Leur structure interne n'a pu être étudiée en détail que sur des coupes ultraminces. Elles n'ont cependant

pas apporté des conclusions rigoureuses car, en plus des difficultés de réalisation, l'histologiste se heurte pour leur étude à un inconvénient majeur.

Du fait de la forte teneur en fer des érythrocytes, ce fer diffracte les électrons, et les images obtenues, même en coupes très minces, sont toujours très opaques.

Après hémolyse, le globule rouge présente un aspect filamenteux qui s'accentue avec l'intensité de l'hémolyse. L'observation du « ghost » ou fantôme d'hématie, terme attribué par les Anglo-Saxons au résidu d'hémolyse et que nous appelons stroma, permet une meilleure visibilité qui n'est cependant pas très précise.

Comment pouvons-nous envisager l'infrastructure de l'hématie ?

Le problème de l'existence du stroma est ancien. Il dépend de l'idée que nous avons de la constitution de l'érythrocyte.

Le globule est-il un ballonnet rempli d'hémoglobine ? Le problème du stroma se réduit alors à celui de la membrane.

Le globule est-il une masse spongieuse imbibée par une solution d'hémoglobine ? Le stroma globulaire est bien alors une sorte de trame de l'hématie. On le définit comme le résidu globulaire après hémolyse. Mais ce qui reste après hémolyse n'est pas obligatoirement ce qui existait auparavant, remarque Policard (219).

Des constituants propres ont pu être entraînés avec l'hémoglobine.

Waugh et Schmitt (285), Lovelock (165), Ponder et Ponder (234), ont reconnu une perte de protéines et de lipides au cours du lavage des globules rouges par des solutions hypotoniques de chlorure de sodium.

En réalité, suivant cette hypothèse, ce qui reste après hémolyse, le « ghost » ou stroma, serait l'ensemble d'une membrane et du contenu interne sans hémoglobine.

Les données chimiques apportent des faits à l'appui des deux conceptions du stroma.

Il y aurait, tout d'abord, dans celui-ci une quantité de lipides à peine suffisante pour former autour du globule une mince couche lipidique.

D'un autre côté, il ne semble pas que la totalité des protéines soit localisée dans la membrane; il en existerait aussi à l'intérieur du globule et on a cependant parfois affirmé l'absence de tout stroma au milieu de l'hématie.

Dans cette conception, on pourrait schématiser ainsi le globule rouge et sa membrane : en son centre, l'hématie serait constituée par de l'hémoglobine, solution ou gel : Ponder (225). A la périphérie existerait une membrane lipoprotéique. Entre les deux, une zone plus ou moins épaisse contiendrait quelques molécules fibreuses unies à des molécules d'hémoglobine. Cette région intermédiaire aurait les propriétés d'un gel. Elle correspondrait à ce que certains auteurs ont appelé la « croûte ».

C'est à son niveau que se localiseraient les processus métaboliques.

Le globule ne serait donc pas un vrai ballon, mais un ensemble creux, comportant une cavité centrale et une écorce protidohémoglobinique plus ou moins épaisse, limitée par une mince membrane lipoprotéique.

De nombreuses hypothèses ont précédé cette conception actuelle. A l'étude physique de la membrane du globule rouge se rattachent de nombreux travaux, en particulier de Danielli (55), de Harvey (110), de Picken (218), de Schmitt (254).

L'ancienne théorie d'Overton imaginant la membrane comme une couche lipidique où les lipides seraient maintenus en place et orientés par les protéines est aujourd'hui abandonnée.

L'existence d'une couche lipidique continue, si elle peut expliquer les conditions de perméabilité de la membrane, n'explique pas la tension de la surface et ses propriétés d'élasticité.

Une conception un peu analogue de Mitchison (197, 198) tendait à représenter la surface érythrocytaire comme une fine pellicule de lipides, étendue sur une épaisse couche hydratée de protéines. Le globule rouge serait la superposition de diverses couches comprenant

de l'intérieur vers l'extérieur : l'hémoglobine, une protéine : la stromatine, des phospholipides dont les chaînes d'acides gras seraient disposées à la surface de l'hématie.

Ces conceptions ont été récemment combattues. E c'est en grande partie à PONDER (233, 226, 253) que nous devons de savoir aujourd'hui comment sont associés entre eux lipides et protéines dans la membrane globulaire.

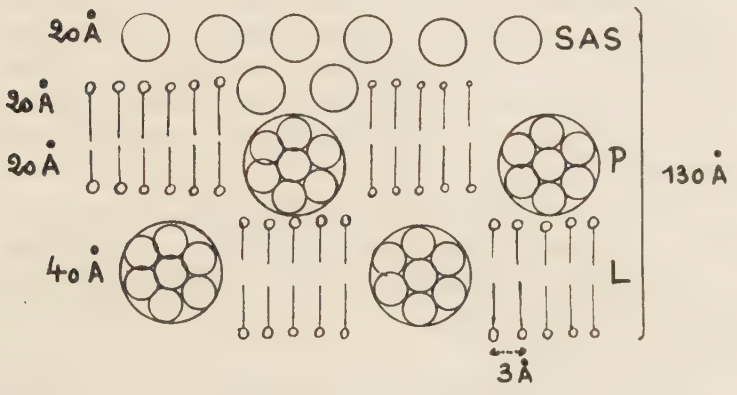

Figure 7

Structure de la surface externe de l'hématie d'après PONDER (226) Elle représente de haut en bas :
— une couche de substance antisphérante ;
— une palissade lipidique (double couche lipidique, chacune ayant une épaisseur de 20 Å) ;
— des protéines (parallèles à la surface de l'hématie).

La figure 7 empruntée à PONDER nous montre cette structure.

Les lipides formeraient deux couches de 20 Å d'épaisseur chacune, lorsque ces couches sont continues. Les molécules lipidiques formeraient une palissade bimoléculaire bien orientée à la surface; les protéines constituant des couches entre celles des lipides.

PARPART et DZIEMAN (211) ont montré que la couche protéique avait sensiblement la même épaisseur que la couche lipidique, c'est-à-dire 40 Å, avec quelques variations d'un animal à l'autre.

Le long axe des protéines est orienté tangentiellement à la surface alors que les micelles lipidiques sont disposées radialement.

Une disposition à peu près semblable a été décrite par Frey-Wissling (87), dont la conception de structure rejoint celle donnée par Ponder.

La disposition radiale des lipides correspond à une palissade de molécules de céphalines, de lécithines, de sphingomyélines dont les extrémités d'acides gras s'orientent vers le milieu environnant.

A la périphérie du globule se trouvent des molécules d'albumine, disposées, comme les autres protéines, tangentiellement; leur taille est aussi de 20 Å. Ces protéines seraient, d'après Furchgott et Ponder (89) responsables du maintien de la forme discoïde de l'hématie et mériteraient pour cela leur nomination de substances anti-sphérantes.

L'hématie peut donc être schématisée par une surface à l'infrastructure comprenant des lipides et des protéines hautement orientés, entourant de l'hémoglobine qui possèderait une orientation un peu plus définie que celle d'une solution.

Le schéma 8 emprunté à Ponder (233), montre la répartition des constituants lipoprotéiques et de l'hémoglobine à divers étages de la membrane globulaire.

Il montre que le globule rouge possède une concentration lipoprotéique plus élevée à la surface et plus faible à l'intérieur, la concentration en hémoglobine étant, au contraire, plus importante au centre. Celle-ci n'est cependant pas nulle à la surface.

En un point A, en profondeur de la cellule, la structure se compose presque uniquement d'hémoglobine ; en B l'hémoglobine prédomine encore, mais en C la structure est surtout lipoprotéique (schéma 8).

Cependant l'hémoglobine existe encore en D et fait partie de l'infrastructure de la membrane.

Cette illustration découle de constatations expérimentales.

Au cours de la préparation des stromas : l'hémolyse, l'eau glacée, la saponine ou les solutions chlorurées sodiques progressivement hypotoniques, donnent toujours des stromas renfermant un peu d'hémoglobine.

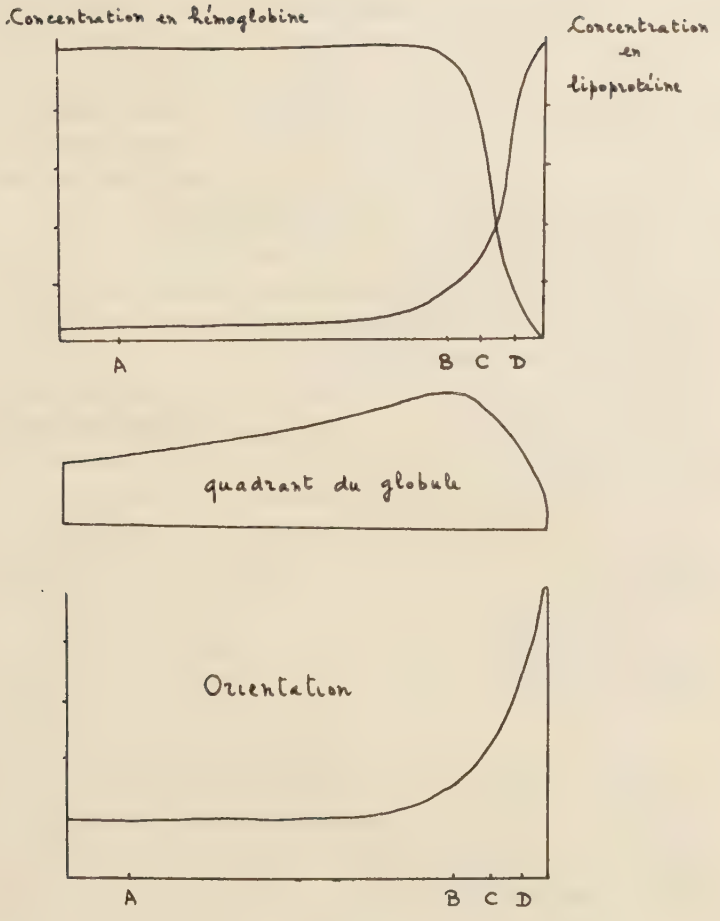

Figure 8

Diagramme de la structure du globule rouge selon PONDER (233)

Comme l'ont affirmé TISCHKOFF (266) puis PONDER (227), une partie de l'hémoglobine est unie sous la forme d'un complexe aux lipoprotéines du stroma.

TSUDA (272) constate qu'un très grand nombre de lavages des hématies n'entraîne pas toute l'hémoglobine. Cette hémoglobine résiduelle, contenue dans le stroma représenterait, selon DRABKIN (73) 2 % de sa totalité. Il est possible que sa valeur réelle soit plus élevée.

En effet un grand nombre de lavages permettrait de débarrasser le stroma au maximum de son hémoglobine

mais provoquerait une importante dénaturation, et une partie de ses constituants serait entraînée avec l'hémoglobine.

Dans l'hématie les molécules d'hémoglobine ne seraient pas libres comme elles le seraient dans une solution ; chaque molécule serait associée avec d'autres molécules pour constituer un petit groupement.

Cela explique sans doute l'association stable hémoglobine-lipoprotéine. Les molécules d'hémoglobine seraient en rapport avec l'orientation des lipoprotéines, de telle sorte qu'elles feraient partie intégrante de la membrane.

L'orientation des molécules d'hémoglobine décroit vers l'intérieur avec la diminution des lipoprotéines pour atteindre une orientation minimum, c'est selon le terme de PONDER le « short order » de l'hémoglobine.

Le schéma 8 illustre le fait que le globule rouge est « orienté » à différents degrés dans toute l'épaisseur de sa structure.

Cette structure peut donc se résumer ainsi : le cytoplasme, très peu abondant au centre est condensé à la périphérie où il formerait le stroma.

Nous ne savons pas si le globule rouge possède, comme les bacilles, une membrane protoplasmique. Cette membrane, bien qu'elle ait été contestée, existerait chez les germes et SALTON (251 *bis*) a pu affirmer sa complexité chez les bacilles gram négatifs.

Elle serait constituée par des mucopeptides et renfermerait des quantités importantes de lipides et de polysaccacharides. Les lipides y sont très abondants, surtout représentés par des acides polyphosphatidiques.

Quelques auteurs, dont JUNG (129-130) ont considéré la membrane superficielle de l'hématie comme responsable du maintien de sa forme.

Membrane externe, fine, ou épilemme, par opposition au plasmolemme ou croûte, elle renfermerait les substances responsables du transport des ions et les systèmes enzymatiques.

S'agit-il d'une véritable couche organisée ou simplement de l'affleurement de certains constituants de la mosaïque du stroma ?

L'examen des coupes au microscope électronique n'a pas apporté de renseignements précis sur l'existence éventuelle d'une membrane périphérique. Autour de l'hématie on peut voir une zone dense, très fine, beaucoup plus dense que la zone sous-jacente.

Son étude est bien récente et fort imprécise.

Dans la littérature on parle souvent indifféremment de stroma ou de membrane. Nous venons de voir que cette partie périphérique de l'hématie renfermait à côté de protéines et d'un peu d'hémoglobine, une quantité élevée de lipides, surtout des phospholipides.

Ces lipides sont fortement unis aux protéines. Leurs molécules sont disposées perpendiculairement à la surface du globule. Ils seraient responsables en partie de l'absence de réfringence de la membrane.

L'épaisseur de cette membrane superficielle n'est pas connue exactement. Les différentes valeurs trouvées s'expliqueraient selon PONDER (233) par l'état d'hydratation de la cellule. En effet les lipoprotéines desséchées, augmentent beaucoup de volume lorsqu'elles sont ensuite réhydratées.

Les chiffres proposés sont de 120 à 400 Å pour SCHMIDT (285) et pour LATTA (155), parfois même de 5000 Å pour MITCHISON (197-198).

Dans ce dernier cas, la membrane occuperait plus de la moitié du volume de l'hématie. Ceci résoudrait l'opposition existant entre les deux conceptions envisagées sur la structure du globule rouge.

Mais les deux conceptions, ballon renfermant la solution d'hémoglobine et éponge imprégnée de cette solution, nous paraissent devoir être combinées.

On a envisagé l'existence de pores tout le long de cette couche superficielle, FURCHGOTT et PONDER (89) ont affirmé que cette membrane n'est pas uniforme sur toute sa surface, certaines régions, selon BERNHARD (18) seraient plus minces que d'autres.

Ces pores ne laisseraient pas passer l'hémoglobine à l'état normal mais pourraient dans certaines conditions, en s'écartant, permettre ce passage et c'est ce qui se produit au cours de l'hémolyse.

La présence d'une membrane à la périphérie du globule est plus ou moins certaine. Est-ce cette membrane qui explique la stabilité de la forme biconcave des globules ? Nous ne sommes pas en mesure d'y répondre.

Il semblerait en réalité que cette forme soit due à des forces physiques encore mal connues. Le simple lavage, en effet, par une solution isotonique suffit pour faire perdre aux hématies leur forme biconcave et à les rendre sphériques. Nous avons dit que le phénomène était réversible et que l'adjonction d'une petite quantité d'albumine restitue la forme biconcave.

Cette sorte de cuirasse lipidique qui entoure l'hématie, sans doute en cause dans le mécanisme du passage des substances du globule vers l'extérieur et du plasma vers le milieu intraglobulaire, serait aussi responsable des formes diverses que peuvent prendre ces cellules aux yeux des histologistes.

D'apparence régulière et unie au microscope ordinaire, la surface des globules rouges montre en microscopie électronique, par les techniques de moulage, toute une série d'irrégularités de surface. Ces irrégularités ont été dénommées par les histologistes : des cratères, des spicules, des hématexodies. Dervichian et Magnant (60) ont décrit un grand nombre de ces irrégularités de surface.

Les cratères sont des irrégularités creuses, plus ou moins profondes, observées sur des globules normaux. Leur nombre est augmenté dans certaines conditions pathologiques.

Les spicules, sortes de dépressions en croissant, correspondent aux oursins, aisément visibles au microscope optique.

Les hématexodies, sortes de fins filaments, renflés à leurs extrémités, seraient formées, selon Bessis (19), aux dépens de la couche superficielle de l'hématie. Furchott (88) et Waitz (281) les ont décrites comme formant une frange autour du globule lui donnant l'aspect d'une tête de méduse.

Selon Bessis et Bricka (20), (22), et Ponder (231) ces filaments peuvent se détacher de la surface de l'hématie et devenir libres dans le plasma. Ils seraient alors animés

de mouvements browniens. Leur apparition serait due à la séparation de certains constituants lipoprotéiques ou lipidoprotidoglucidiques du reste de la cellule.

Toute différente est la forme en oursin que prennent les globules rouges lorsqu'ils sont lavés au sérum physiologique et lorsqu'on ajoute au plasma diverses substances et en particulier des lécithines.

Ponder (226) qui décrit ces formes épineuses, a montré que leur apparition est empêchée par l'adjonction d'albumine plasmatique au sérum physiologique.

L'albumine serait fortement liée à la paroi, plusieurs nouveaux lavages sans sérumalbumine sont en effet nécessaires pour transformer les hématies en oursins.

L'obtention des globules sphérocytiques, décrits par Bessis (21), à la suite de lavages avec des solutions isotoniques de chlorure de sodium ou de potassium, par l'adjonction de lécithines, par l'alcool ou par vieillissement, est réversible.

Les hématies reprennent leur forme discoide par adjonction de plasma, d'albumine, de gélatine ou de glucose.

En combinant l'action de produits antisphérants et la variation de concentration du milieu salin, on obtient différentes formes.

Toutes ces images s'obtiennent aussi bien sur les globules rouges que sur les stromas globulaires dépourvus d'hémoglobine. Ces diverses formes des hématies sont dues à leurs constituants. Pour Policard et Baud (219), elles seraient peut-être en rapport avec la couche lipidique de la membrane.

De Vries (62), étudiant la morphologie des globules rouges de sang lipémique, observe des changements de forme et l'apparition de crénelures, lorsque le taux des acides gras libres du plasma dépasse un certain seuil. En corrélation avec l'activité de la lipoprotéine-lipase, il y aurait une combinaison des acides gras plasmatiques avec les constituants globulaires aboutissant à cet aspect crénelé.

Au cours des divers processus d'hémolyse, soit par lavage des hématies avec des solutions chlorurées sodi-

ques hypotoniques, soit au contact d'agents lysants à action brutale comme la saponine, le globule rouge perd son aspect discoïde pour prendre des formes contractées diverses, comme si le stroma, sous l'influence d'un stress se repliait sur lui-même.

De remarquables images de stromas agressés ont été reproduites par Ponder et Barretto (232) et par Bessis et Bricka (21).

Toutes ces irrégularités de surface sont plus abondantes lorsque les hématies sont placées dans des milieux autres que le plasma. Des agressions peuvent même faire apparaître des formes nouvelles anormales.

En réalité le mécanisme par lequel se produisent ces irrégularités de surface, est encore obscur.

Propriétés du stroma

I. — *Perméabilité et pénétration des substances*

La perméabilité globulaire serait l'apanage de la partie superficielle de l'hématie, elle dépendrait donc étroitement de sa structure et ferait entrer en jeu l'état fonctionnel de la membrane périphérique.

Les constituants de cette partie du globule, dont nous venons d'envisager la composition, participeraient au mécanisme actif de la pénétration des substances vers l'intérieur.

Quel est ici le rôle joué par les lipides ?

Ponder (226) l'envisage en étudiant la fixation sur les lipoprotéines globulaires du tétradecylsulfate de sodium. La charge négative — SO_3^- se fixerait sur une charge opposée NH_3^+ de céphaline. La molécule entière pivote autour de la charge +, se rapprochant de l'axe de la chaîne carbonée du lipide pour finir en position parallèle, plus stable, où les deux molécules sont accolées.

Il s'est formé un complexe entre le détergent anionique et la lipoprotéine globulaire.

Il nous faut rapidement citer l'existence de substances pouvant se fixer à la fois sur plusieurs globules rouges, provoquant le phénomène d'agglutination.

C'est le cas des virus ou des anticorps se combinant aux antigènes constitutifs du stroma.

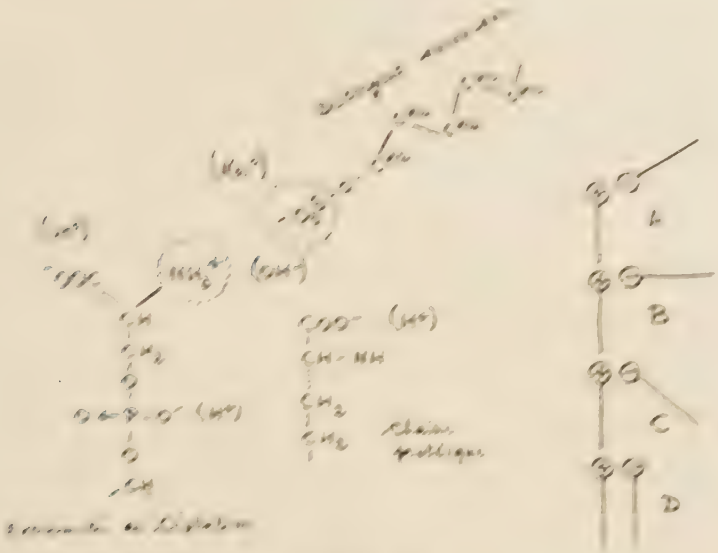

Figure 7

Fixation d'une molécule de désoxyribonucléate de sodium sur les lipoprotéines globulaires d'après Boivin (1951).
A, B, C, D = étapes successives de l'union désoxyribonucléique.

II. — *Propriétés électrophorétiques*

Comme nous l'avons vu, les lipoprotéines appartiennent dans le sérum à la partie externe de l'hématie, des groupements polaires susceptibles de se combiner aux électrons ionisés du milieu ambiant.

[illegible] explique les propriétés électrophorétiques du sérum.

L'étude électrophorétique des constituants lipoprotéiques du sérum a donné lieu à de nombreux travaux.

Schmid et al (1951) isole par électrophorèse une lipoprotéine à propriétés thromboplastiques renfermant des quantités considérables de peptides et de phosphore.

pides, dépourvue de cholestérol et dont les acides gras sont peu saturés.

Prankerd (237-236), dans une étude par électrophorèse des stromas de globules rouges humains, montre l'existence de trois fractions lipoprotéiques, dont deux migrent en tampon véronal de pH = 8,6.

Douste-Blazy (72) et nous-même, avons montré l'existence de deux fractions lipoprotéiques migrant en tampon alcalin. Ces lipoprotéines globulaires se dénaturent plus rapidement que les lipoprotéines plasmatiques; elles ne donnent plus de migration électrophorétique après un séjour des stromas à + 4° pendant 48 heures.

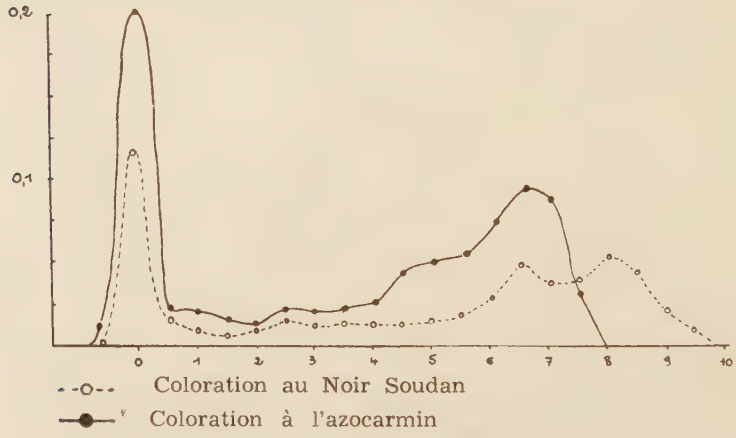

Figure 10

Mobilité électrophorétique des stromas de globules rouges selon Prankerd, Altman, Anderson (236)

C'est la « surface », partie de l'ultrastructure possédant des groupes chargés, qui est responsable du potentiel électrophorétique.

Furchgott (89) a admis que la mobilité des stromas est inchangée quel que soit le procédé qui ait servi à leur isolement : lyse des cellules dans les milieux hypotoniques, lyse par le froid, par addition de chloroforme ou de saponine, par des agents hémolytiques divers.

Si nous rapprochons cette conclusion de celle du travail de Ponder, indiquant que les diverses méthodes de préparation isolent des stromas différents, dans leur

forme, ceux-ci doivent cependant avoir une structure inchangée puisque leur mobilité électrophorétique ne varie pas.

Waugh et Schmidt (285) observent, au cours de la préparation des stromas, une dénaturation des protéines et une perte de protéines et de lipides. Cette perte est variable qualitativement et quantitativement selon l'agent lytique utilisé, selon sa concentration et selon l'état de la cellule sur laquelle il exerce son action.

L'hémolyse, en effet, implique une rupture de l'ultrastructure de la surface en certains points. Nous ne savons pas si les groupements responsables de la mobilité électrophorétique sont restés inaltérés après combinaison avec la substance hémolysante ou après une influence osmotique.

Ponder (226), constatant dans la courbe de mobilité des globules rouges, en fonction du pH, certaines différences, pense à des modifications de la surface des cellules et à un état transitoire entre la surface lisse et la surface rugueuse (qui apparaît en milieu salin isotonique), ceci amène un changement dans la nature des molécules présentes à la surface.

Cet auteur réalise une étude des mobilités des stromas obtenus par des traitements différents et des conditions de pH variables.

Ainsi, variations du pH et traitement auquel sont soumis globules rouges et stromas, ont une action sur les propriétés de la surface et déterminent leur mobilité dans un champ électrique.

D'autre part, la nature du milieu et le traitement des cellules peuvent, ou non, rendre la surface des globules rouges capable d'adsorber des protéines. On a montré que des protéines sont adsorbées par les cellules lorsque celles-ci sont placées dans des solutions suffisamment acides pour produire une agression. Cela explique l'absorption réversible des protéines plasmatiques.

Nous dirons en conclusion que la constance de mobilité électrophorétique est une caractéristique expérimentale des hématies de mammifères et de leurs stromas ;

elle est une propriété de la surface des cellules, lorsque celles-ci ont été débarrassées des substances adsorbées.

Métabolisme des lipides globulaires

Notre but est d'envisager maintenant le métabolisme des lipides globulaires dans l'hématie. Il nous faudra distinguer le métabolisme physiologique, lorsque la cellule est placée dans des conditions favorables, et le métabolisme pathologique des lipides, lorsque la structure de l'hématie ne sera plus intacte ou qu'elle aura été soumise, d'une façon plus ou moins durable, à une perturbation moléculaire.

I. — METABOLISME NORMAL.

On connaît depuis assez longtemps le métabolisme des protéines et surtout celui de l'hémoglobine dans l'érythrocyte. Bien moins connu, et d'étude plus récente, est le renouvellement des molécules lipidiques. Les progrès les plus marqués ont été apportés par l'utilisation des isotopes.

L'étude de ce métabolisme est liée à celle de la structure globulaire.

La biosynthèse des acides gras, celle des phospholipides, l'étude comparée du turnover des divers lipides vont nous apporter des éléments nouveaux dans la connaissance de la structure des globules rouges et de leurs propriétés.

Polonovski (214), à la suite de travaux réalisés avec des lipides marqués, pense que tous les lipides globulaires ne seraient pas des constituants réels de l'hématie. En effet, l'emploi des isotopes montre un échange rapide entre les lipides plasmatiques et ceux de la périphérie du globule qui fait penser à la fixation de certains lipides plasmatiques sur la membrane érythocytaire.

Cette membrane serait le siège de nombreuses réactions biochimiques où les lipides prennent une part importante.

Il nous paraît essentiel de signaler que certains résultats concernant l'étude métabolique des lipides globulaires, à l'aide d'éléments marqués, peuvent être perturbés, dans une certaine mesure, du fait de la présence des leucocytes à côté des globules rouges.

De nombreux auteurs, dont Webb, Allison et James (286), Polonovski (214), ont observé que les leucocytes ont un pouvoir de synthèse lipidique plus grand que les globules rouges.

Les leucocytes doivent être, pour cela, éliminés des échantillons de globules rouges. Rowe, Allison, Lovelock (251), ont montré que l'incorporation de l'acétate marqué dans les acides gras des glycérides sanguins des différentes fractions lipidiques, était proportionnelle au nombre de leucocytes présents dans la fraction.

Comment se répartit l'importance de cette activité métabolique entre leucocytes et érythrocytes à divers stades d'évolution ?

Webb et ses collaborateurs (286) ont retrouvé l'activité métabolique la plus intense dans les globules blancs; dans l'hématie, la synthèse lipidique était d'autant plus importante que cette cellule était prise à un stade plus jeune de son évolution.

Dans le sang total, si l'on considère que pour 1 leucocyte il existe 300 érythrocytes jeunes et 1.000 érythocytes mûrs, chacun de ces divers types de cellules, concluent Webb et ses collaborateurs (286), participe pour la même part à la synthèse lipidique. Cet exemple confirme encore un pouvoir de synthèse bien supérieur au niveau des leucocytes.

Les globules rouges auraient un pouvoir de synthèse des lipides parallèle à la possibilité d'incorporation du glycocolle marqué, par l'hémoglobine.

L'hématie est le siège de processus synthétiques intenses, comme le montre l'incorporation du ^{32}P dans l'ATP (2,7).

Nous ne savons cependant pas où s'effectue cette synthèse. S'effectue-t-elle dans le stroma qui rassemble la presque totalité des lipides, ou bien a-t-elle lieu à l'intérieur du globule où se trouvent probablement enzymes et cofacteurs ? Il est logique de penser que le stroma en est le siège, car son intégrité structurale est une condition nécessaire à cette biosynthèse. L'hémolyse, en effet, supprime la formation des acides gras.

D'autres preuves ont été apportées à l'appui de cette hypothèse. Lovelock (164) a montré que sous l'influence d'un choc thermique, le stroma globulaire, après altération de ses lipoprotéines et de ses lipides, présentait des activités métaboliques réduites.

Altman et Swisher (7) ont trouvé une nette diminution du pouvoir d'incorporation de l'acétate 2 C^{14} par le stroma de globules rouges en fonction du temps, même après conservation à 37°. Ceci est attribué à une altération de l'état dynamique de ses constituants lipidiques.

Il n'est pas non plus possible d'affirmer d'où vient l'énergie nécessaire à cette biosynthèse. Certains faits cependant, et en particulier la formation d'acides gras marqués à partir de glucose isotopique permettent de penser que cette énergie pourrait provenir de la glycolyse.

Nous avons déjà insisté sur l'importance de cette glycolyse.

1. - Biosynthèse des acides gras.

Les acides gras sont-ils synthétisés au niveau de l'hématie ? Altman (5, 6) le premier, attribue aux globules rouges humains un intense pouvoir de synthèse des acides gras à partir de l'acétate, in vivo.

Après lui, James, Lovelock et Webb (125-126) ont obtenu l'incorporation de l'acétate marqué dans les acides gras des hématies.

Parmi les acides gras saturés, l'acide stéarique est celui qui incorpore le plus l'acétate marqué. Les acides gras insaturés (linoléique et arachidonique) ont une activité plus grande que celle de l'acide palmitique.

Il semblerait donc que l'hématie, grâce à des systèmes enzymatiques et grâce à des coenzymes qui lui sont propres, synthétise elle-même ses acides gras, qu'ils soient ou non saturés.

Restait à étudier l'incorporation de ces acides gras dans les diverses fractions lipidiques des hématies.

WEBB, ALLISON et JAMES (286), utilisant aussi l'acétate marqué au C^{14} ont montré que les longues chaînes d'acides gras, saturés ou insaturés, sont incorporées, dès leur formation, dans les triglycérides, dans les phospholipides et les esters du cholestérol.

2. - BIOSYNTHÈSE DU CHOLESTÉROL.

Elle paraît être très faible dans l'hématie.

WEBB, ALLISON et JAMES (286) ont montré que des substances de l'insaponifiable, de nature stérolique, sont synthétisées aussi à partir de l'acétate.

MUIR, PERRONE et POPJAK (202) étudiant le métabolisme des globules rouges circulants chez le lapin après incorporation d'acétate 1 et 2 C^{14} démontraient que le cholestérol globulaire était métaboliquement actif.

Son turnover serait rapide ; la concentration en isotope atteignant un maximum après 24 heures, diminuerait rapidement. Pour ces auteurs donc, le cholestérol globulaire serait renouvelé en partie par un mécanisme synthétique, mais aussi par échange avec le cholestérol plasmatique.

Il se dégage, à l'opposé, des travaux de ECKLER (76) et de LONDON (162) que le cholestérol des érythrocytes humains aurait uniquement une origine plasmatique.

A l'inverse des glycérides qui, selon LOVELOCK, JAMES et ROWE (166) ne seraient pas échangés entre les hématies et les lipoprotéines plasmatiques, ces auteurs avaient envisagé un échange portant à la fois sur les phospholipides et sur les lipides insaponifiables.

Mais par la suite, ils ont reconnu que la radio-activité dûe au cholestérol (qui représente 90 % des lipides insaponifiables) était très faible et que la plus grande partie de l'activité de l'insaponifiable, revenait à un résidu

obtenu après précipitation par le digitonoside, donc à d'autres stérols ou à des produits intermédiaires.

Nous ne pouvons donc affirmer pour le cholestérol une biosynthèse «in situ» ; il semble qu'au contraire le cholestérol globulaire trouve son origine dans le plasma.

3. - Biosynthèse des phosphatides.

Les études sur la biosynthèse des lipides phosphorés dans le globule rouge sont nombreuses.

Hahn et Hevesy (102), Zilversmit (303), il y a déjà longtemps, avaient suggéré un échange rapide entre lipides plasmatiques et lipides globulaires.

Altman (5), étudiant le turnover des constituants des stromas de globules rouges de lapin après incorporation d'acétate 1 C^{14}, montre qu'une partie de l'activité des globules rouges proviendrait des lipides plasmatiques. Mais la présence du plasma ne serait pas nécessaire et les hématies en solution isotonique incorporeraient l'acétate marqué. L'activité serait répartie entre les fractions glucidiques et lipidiques, l'activité la plus forte étant retrouvée dans les sphingolipides.

A coup sûr, les phospholipides, plus abondants dans l'hématie que dans le plasma, jouent un rôle important dans la vie de ces cellules. Leur rôle a été l'objet de multiples travaux et il est possible, comme l'ont affirmé James, Lovelock et Webb (126) que ces phosphatides, synthétisés dans la membrane de l'érythrocyte, soient ensuite échangés avec les lipoprotéines plasmatiques.

Quoiqu'il en soit, la part de biosynthèse revenant à l'hématie dans la genèse des phospholipides plasmatiques est faible à côté de la part que joue le système hépatique.

Schauer et Hillman (252) ont récemment démontré l'existence dans la membrane des globules rouges d'un accepteur de phosphate, de nature inconnue, possédant une grande activité spécifique, 20 à 30 fois supérieure à celle de l'ATP. Cet accepteur de phosphate fait intimement partie du stroma.

Peut-être doit-on voir dans la mise en évidence de ce composé, l'origine des phosphatides globulaires. L'étude

de la biosynthèse des phospholipides, in vivo, dans les globules rouges à divers stades de leur évolution, a amené quelques auteurs, dont HEVESY et ALLEN (111), LAWRENCE (156) et SINCLAIR (259) à conclure à une synthèse, uniquement pour des stades très jeunes.

L'état actuel de nos connaissances réside dans les conclusions de travaux récents de ROWE (166-249-250) et de POLONOVSKI (213).

ROWE a montré que les cellules sanguines (globules rouges, leucocytes et plaquettes) synthétisent les phosphatides puis les échangent entre elles et avec le plasma. En effet, le maximum de radioactivité est retrouvé dans les phosphatides cellulaires qui sont ensuite « excrétés » dans le plasma.

ROWE a décelé en outre une activité spécifique plus élevée dans les lécithines et sphingomyélines plasmatiques que dans ces mêmes phospholipides du compartiment cellulaire.

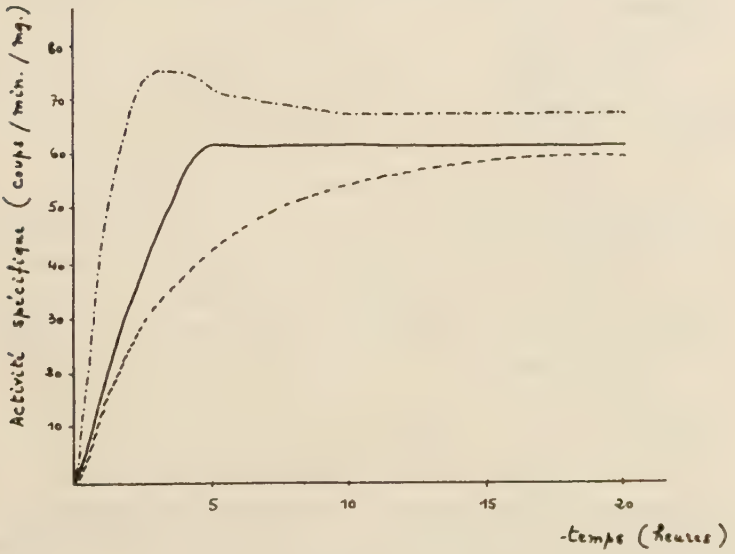

Figure 11

Marquage des phospholipides de sang humain après incubation avec de l'acétate radioactif selon LOVELOCK, JAMES et ROWE (166)

——— Phospholipides des cellules

- - - - - Phospholipides des α lipoprotéines

-.-.-.-. Phospholipides des β liproprotéines

Ce fait peut faire penser que seules quelques fractions des phosphatides globulaires participent à la biosynthèse et à l'échange.

A l'appui de cette théorie, ROWE a invoqué des différences importantes dans la constitution des lécithines cellulaires et plasmatiques.

Les lécithines globulaires contiennent de l'acide arachidonique, les lécithines du plasma n'en renferment pas. De plus lécithines cellulaires et plasmatiques diffèrent par leurs pourcentages en acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique.

Cette observation ne nous apparaît pas cependant comme une conclusion irréfutable, car les molécules phospholipidiques doivent présenter un perpétuel renouvellement dans leur composition en acides gras.

LOVELOCK, JAMES et ROWE (166) ont montré dans le schéma 11, que les courbes d'activité spécifique des phospholipides plasmatiques et globulaires sont complémentaires. Ceci semble en faveur d'un échange des phospholipides à la suite d'un simple équilibre de diffusion qui serait rapide.

PAYSANT-DIAMANT et POLONOVSKI (213) ont également étudié l'incorporation *in vivo* du ^{32}P dans les phospholipides globulaires chez l'homme.

Tous les phospholipides sont marqués. Mais la mesure des activités spécifiques montre des taux d'incorporation de ^{32}P différents selon les divers constituants lipidiques.

Sphingomyélines, lécithines et céphalines, qui représentent la presque totalité des phosphatides globulaires, sont peu radioactifs.

Les lysocithines sont plus radioactives que les lécithines.

Le maximum d'activité spécifique est retrouvé au niveau des acides phosphatidiques. Ces constituants qui ne représentent que 5 à 6 % du phosphore total des hématies, retiennent 60 % du ^{32}P incorporé.

A la suite de KENNEDY (136), qui attribue aux acides phosphatidiques un rôle métabolique de premier plan dans la biosynthèse des phospholipides et des triglycérides, POLONOVSKI, notant à la fois leur grande vitesse de

biosynthèse et leur absence d'accumulation, pense qu'ils jouent dans le stroma lipoprotéique un rôle dans la formation des autres phosphatides mais aussi sans doute un rôle de transport actif.

Ce rôle de transport leur avait déjà été attribué par HOKIN (117) qui montrait que l'incorporation importante du ^{32}P dans les phospholipides de la glande à sel des oiseaux marins était dûe aux acides phosphatidiques.

Peut-être pouvons-nous envisager dans l'hématie un mécanisme de formation semblable à celui reconnu par HOKIN dans les autres cellules.

La biosynthèse des acides phosphatidiques ferait intervenir un enzyme présent dans les membranes cellulaires : la diglycéride-kinase. L'acide phosphatidique formé, s'unirait ensuite au sodium puis ce phosphatidate de sodium serait scindé en phosphate de sodium et en diglycéride, par l'intermédiaire de la phosphatidate-phosphatase. La présence de cet enzyme expliquerait le fait que les acides phosphatidiques ne s'accumulent pas.

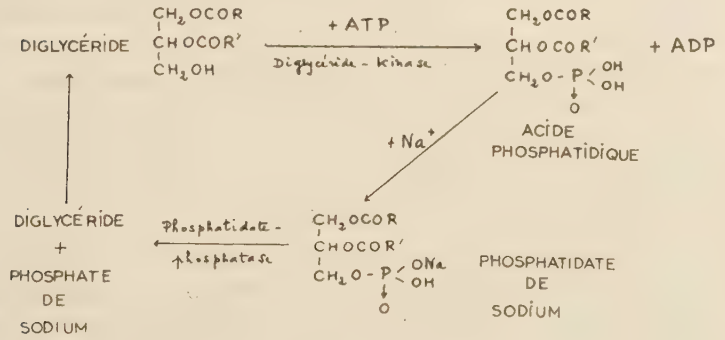

Figure 12

Schéma du cycle des acides phosphatidiques selon HOKIN (117)

Il semblerait, en effet, comme l'a montré KIRSHNER (143) que l'hématie « excrète » des ions sodium dans le plasma et la présence d'ATP serait pour cela indispensable.

Dans leur remarquable travail sur l'incorporation du ^{32}P dans les hématies en présence de plasma, PAYSANT-DIAMANT et POLONOVSKI (214) ont montré que le marquage

était très faible par rapport à l'incorporation en solution chlorurée sodique isotonique. Ils soulignent par ce fait la participation des acides phosphatidiques aux échanges des électrolytes.

A la suite de ces constatations POLONOVSKI (22) pense que la biosynthèse des phospholipides s'effectue très bien au cours de la genèse des érythrocytes et que ces lipides sont intégrés dans les lipoprotéines du stroma dès la naissance de ces cellules.

Il envisage un aspect dualiste du bagage phospholipidique des membranes, qui posséderaient deux types de phosphatides :

— des phosphoaminolipides synthétisés alors que la cellule est encore très jeune et qui seraient maintenus jusqu'à leur mort. Ils auraient ainsi un rôle plastique ;
— des acides phosphatidiques, à fonction métabolique rapide, possédant un rôle dynamique et se renouvelant sans cesse.

Si les acides phosphatiques présentent une incorporation notable du ^{32}P due à leur renouvellement incessant, à l'opposé, les phosphatides à fonction surtout plastique ne présenteraient que de très faibles incorporations.

Ceci explique sans doute que les sphingomyélines et les céphalines des globules rouges de rat n'incorporent pratiquement pas le ^{32}P *in vivo*, comme l'ont montré PAYSANT-DIAMANT et POLONOVSKI (213).

Alors que ROWE attribuait le maximum d'incorporation aux céphalines, POLONOVSKI à l'opposé, a montré que les céphalines incorporent très peu le ^{32}P et que 60 % de l'activité globale est retrouvée dans les acides phosphatidiques.

4. - ECHANGE DES LIPIDES ENTRE HÉMATIES ET PLASMA.

Nous savons peu de choses de l'échange des molécules lipidiques entre les divers compartiments sanguins.

Nos connaissances actuelles se résument aux expériences réalisées par WEBB, ALLISON et JAMES (286) réalisant l'incubation de sang total avec de l'acétate marqué à 37°.

L'isolement ultérieur des α et β lipoprotéines plasmatiques, des phospholipides et des lipides solubles dans l'acétone des hématies a permis de comparer les vitesses de renouvellement des molécules lipidiques dans les diverses fractions.

Lipides plasmatiques et lipides globulaires sont marqués. Mais l'incorporation est plus importante, au début, dans les lipides globulaires puis le renouvellement devient prépondérant dans les lipoprotéines plasmatiques.

L'activité spécifique des stromas de globules rouges augmenterait considérablement dès la première heure d'incubation. Un maximum serait atteint vers la quatrième heure. A ce moment 2 % de l'acétate serait incorporé dans les lipides des stromas.

Après quatre heures d'incubation l'activité spécifique des lipides solubles dans l'acétone des cellules et des α-lipoprotéines plasmatiques seraient sensiblement égales. Les lipides acétonosolubles des β-lipoprotéines plasmatiques ne montrent aucun incorporation, même après incubation prolongée (fig. 13).

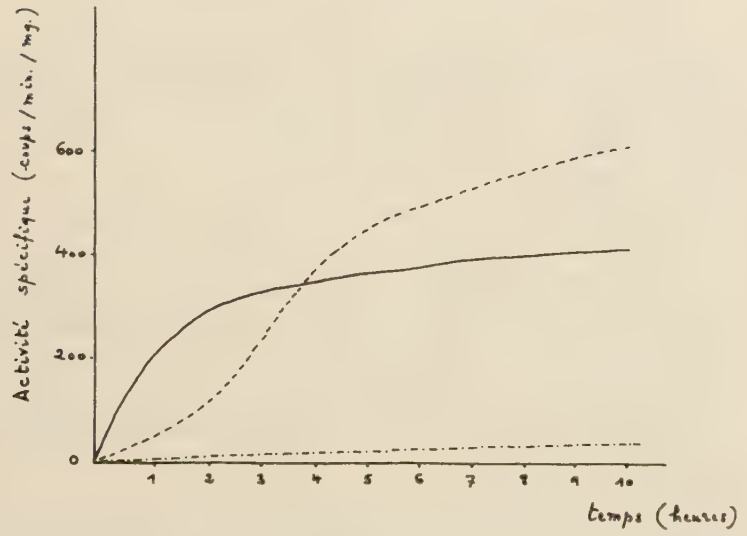

Figure 13

Marquage des graisses neutres après incubation de sang humain avec de l'acétate radioactif selon Lovelock, James et Rowe (166)

——— Graisses neutres des cellules

- - - - - Graisses neutres des α lipoprotéines

-.-.-.-. Graisses neutres des β lipoprotéines

De l'incubation pendant 5 heures à 37° de plasma marqué et de globules rouges inertes, JAMES conclut à un échange rapide des lipides entre les cellules et le plasma. Les résultats seraient en faveur d'un échange des phospholipides entre les hématies et le plasma avec un turnover de 4 à 5 heures.

Sans doute donc, les hématies seraient capables de synthétiser elles-mêmes une grande partie de leurs acides gras, saturés et insaturés ; ces acides gras, incorporés dans les glycérides puis dans les phospholipides, seraient ensuite échangés avec les lipoprotéines plasmatiques.

Ces conclusions ne nous satisfont pas entièrement car la présence des leucocytes et des plaquettes sanguines vient à coup sûr ajouter le métabolisme de ces cellules à celui des hématies.

Il reste sans doute beaucoup à apprendre encore sur le mécanisme des échanges lipidiques dans le sang.

II. - METABOLISME PATHOLOGIQUE.

Lors du vieillissement des cellules rouges certains phénomènes cytochimiques font apparaître à la périphérie du globule, des vacuoles lipidiques de dégénérescence. Mais ce n'est pas le mécanisme de la mort des hématies qui nous intéresse.

Nous nous attacherons ici surtout aux variations des lipides globulaires au cours de diverses affections.

Etant donné le rôle important attribué aux lipides dans la perméabilité globulaire, on conçoit l'intérêt qu'il y aura à préciser la participation de ces molécules aux multiples malformations des membranes globulaires.

Certaines affections globulaires s'accompagnent d'une altération du stroma.

Au premier plan de la pathogénie des hématies se placent les maladies hémolytiques. Ces affections mettent-elles en cause les molécules lipidiques ? Divers travaux ont été axés sur ce problème.

MUNN (204) étudiant les globules rouges dans quelques cas d'hémoglobinurie nocturne paroxystique, con-

clut à une anamolie de leur constitution lipidique. Phospholipides et cholestérol seraient augmentés bien que le rapport $\frac{\text{phosphore}}{\text{cholestérol}}$ reste normal.

Leur teneur en acide oléique serait faible ; par contre ils renfermeraient davantage d'acide arachidonique que les globules normaux.

En même temps qu'une augmentation du cholestérol, selon HARRIS (108), il y aurait une diminution du taux des lécithines et une augmentation des phosphatidylsérines.

La nature des lipides globulaires a été mise en cause par PONDER (229) dans de nombreuses affections hémolytiques. ERICKSON (79) résume dans le tableau 14 les modifications lipidiques notées au cours de diverses anémies.

TABLEAU 14

VARIATIONS DES LIPIDES GLOBULAIRES AU COURS DES DIVERSES ANEMIES (ERICKSON (79)

(en mg pour 100 ml d'hématies)

	Lipides totaux	*Phospholipides*	*Cholestérol*	*Esters de cholestérol*	*Graisses neutres et cérébrosides*
Normales.	400	230	120	19	44
Anémie drépanocytaire . .	493	258	167	30	40
Anémie érythroblastique	795	326	181	11	285
Ictère hémolytique.	359	185	112	29	42
Anémie hypochrome	368	207	119	19	29
Anémie pernicieuse	414	217	191	95	20
Polycythémie.	631	407	140	14	75

Elles semblent caractérisées par une légère diminution des phospholipides. Les variations du cholestérol ne permettent pas de rapprocher entre eux les divers syndromes anémiques, bien que ROBSCHEIT-ROBBINS et WHIPPLE (246) aient rapporté pour ces anémies hémoly-

tiques des variations des lipides totaux avec un abaissement du cholestérol.

Nos connaissances dans ces affections sont bien embryonnaires et l'on ne peut affirmer sans erreur une relation entre l'hémolyse pathologique et les variations des lipides globulaires.

Il n'est pas certain qu'elles soient liées à une anomalie métabolique ou à une modification de l'édifice lipoprotéique de la membrane globulaire.

Des études plus approfondies des lipides du stroma, de ses lipoprotéines et de leur influence dans le mécanisme de perméabilité globulaire nous permettront, peut-être, un jour de mieux connaître la pathologie de l'hémolyse.

D'autres affections s'accompagnent plus particulièrement d'altérations du stroma ; nous envisagerons successivement le rôle joué par les lipides dans la sphérocytose, la sicklanémie, l'acanthocytose.

1. - Sphérocytose.

Grâce à Prankerd (238) nous savons que les hématies sphérocytiques présentent des anomalies du métabolisme des glucides et des électrolytes. L'étude de leurs lipides a retenu l'attention de Kates, Allison et James (133) d'une part, de De Gier et Van Deenen (92), d'autre part.

Selon Kates, sphérocytes et hématies normales posséderaient les mêmes acides gras, à des taux identiques ; par contre les sphérocytes montreraient une concentration plus élevée en phospholipides.

La différence essentielle résiderait dans le fait qu'ils possèdent un taux plus élevé de lysophosphatidyléthanolamines et à l'inverse, une plus faible proportion de phosphatidyléthanolamines.

Les auteurs ont pu obtenir la formation de sphérocytes en faisant incuber des céphalines avec des globules rouges normaux.

Le trouble résiderait donc dans l'impossibilité pour les globules sphérocytiques de transformer les lysophos-

phatidyléthanolamines en phosphatidyléthanolamines. Les autres différences observées ne seraient que des conséquences de ce trouble.

Comment pouvait-on envisager l'origine de cette affection ?

KATES, ALLISON et JAMES (133) ont supposé deux interprétations possibles. La première serait que les globules rouges de sphérocytose héréditaire possèderaient un enzyme, une phosphatidase A qui hydrolyserait les phosphatidyléthanolamines en lysophosphatidyléthanolamines.

On comprend alors mal pourquoi l'action de cet enzyme ne se manifeste pas aussi sur les lécithines pour former des lysocithines, selon un mécanisme envisagé par LONG et PENNY (163).

Car lécithines et lysocithines des hématies normales et des sphérocytes sont à des taux identiques.

KATES envisage alors une autre explication qui semble plus satisfaisante.

La sphérocytose héréditaire serait due à un blocage partiel, ou même total, de la biosynthèse des phosphatidyléthanolamines, elle serait une affection par « manque d'enzyme ». Cette anomalie génétique entraînerait un blocage partiel ou total du système enzymatique qui fait la conversion des lysophosphatidyléthanolamines en phosphatidyléthanolamines.

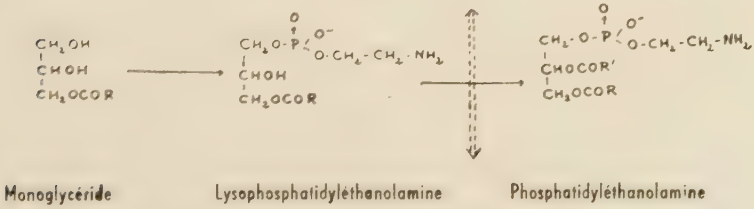

Figure 15

Blocage dans l'étape de transformation des lysophosphatidyléthanolamines en phosphatidyléthanolamines, au cours de la sphérocytose, selon DE GIER et VAN DEENEN (92)

LANDS (151) a décrit dans le foie de rat un système enzymatique voisin qui catalyse l'acylation des lysocithines en lécithines.

Le blocage du mécanisme enzymatique n'est jamais total chez les hétérozygotes qui possèdent un gène normal.

KATES, ALLISON et JAMES ont démontré que lysolécithines et lysocéphalines sont les seuls phosphatides capables d'induire la sphéroformation des hématies.

Rejettant l'hypothèse de BERGENHEM et FARHAEUS (17) selon laquelle les lysocithines joueraient un rôle dans la sphérocytose, les auteurs mettent seulement en cause les lysophosphatidyléthanolamines.

L'anomalie de cette affection réside-t-elle dans la composition lipidique ou bien celle-ci est-elle liée à un trouble métabolique primaire par exemple dans le transport de l'ion phosphate et de l'ion sodium ?

Il est remarquable que seules les céphalines sont modifiées, les autres phospholipides restant normaux.

Il semble donc probable que nous soyons en présence d'une affection lipidique, se traduisant par une accumulation de lysocéphalines à la suite du blocage partiel de l'étape finale de la synthèse des céphalines. Les troubles métaboliques concernant la forme de ces globules rouges et la perméabilité de leurs membranes seraient la conséquence de cette malformation.

Sur le plan métabolique KATES, ALLISON et JAMES (4) ont montré que l'incorporation du ^{32}P est plus importante dans les sphérocytes que dans les globules rouges normaux. Ils ont pensé à une influence possible des leucocytes qui pourraient être rendus en partie responsables de la synthèse des phospholipides globulaires.

Des résultats tout à fait opposés à ceux de KATES, ont été publiés par DE GIER et VAN DEENEN (92). Pour ces derniers les phospholipides sont rencontrés en quantités égales dans les sphérocytes et les globules normaux. Il en est de même dans l'elliptocytose héréditaire.

Le tableau 16 résume les taux des phospholipides des sphérocytes et des elliptocytes indiqués par ALLISON (4) et par DE GIER (92).

TABLEAU 16

COMPOSITION PHOSPHOLIPIDIQUE DES SPHEROCYTES

	Hématies normales		*Sphérocytes*	
	Allison	De Gier	Allison	De Gier
Lysolécithines	3,3	2	3,5	2
Sphingomyélines.				
+ Lysocéphalines	23	32	33	32,5
Lécithines	45	36	44	36
Phosphatidyléthanolamines. .	28	30	19	29,5
Acides phosphatidiques	0,7		1,1	

Comment expliquer ces résultats contradictoires ?

De Gier et Van Deenen (91) ont montré que les phosphatidyléthanolamines sont des composés extrêmement instables. La conservation d'échantillons lipidiques de globules rouges normaux, de sphérocytes ou d'elliptocytes à sec, même sous vide, en présence d'anhydride phosphorique à 2°, à l'obscurité, entraîne une décomposition des céphalines et la formation de composés migrant en chromatographie sur papier comme des lysocéphalines obtenues après action sur des céphalines, de venins de serpent.

Nous signalerons d'autre part avec Hanahan (105) que lorsque le prélèvement de sang est effectué sur héparine, les phosphatidyléthanolamines des globules rouges ont tendance à former des lysodérivés.

2. - Sicklanémie.

Dans une étude des stromas d'hématies falciformes, Klipstein et Ranney (148) signalent que ces stromas contiennent davantage d'hémoglobine que des stromas d'hématies normales.

Nos connaissances sur le rôle des lipides dans la malformation des hématies en faucilles sont embryonnaires. Nous ne connaissons aussi que très peu la valeur des diverses fractions lipidiques.

Nous avons cherché à apporter quelques résultats dans ce domaine, ils sont exposés par ailleurs.

3. - Acanthocytose.

Lorsqu'au cours des transfusions on injecte au malade des hématies normales elles prennent dès la première heure une forme crénelée typique ressemblant à des feuilles d'acanthe. Cette forme des hématies, acquise dès l'arrivée dans le flot sanguin, est irréversible, à l'inverse de l'apparition des crénelures dans l'acanthocytose expérimentale, provoquée par des substances chimiques et dont le mode d'action semble être une modification de l'équilibre ionique entre les hématies et le milieu ambiant.

Cette affection est extrêmement rare. Elle se traduit par des modifications importantes des lipides sanguins et par une absence de β-lipoprotéines plasmatiques.

Druez, Polonovski et Rey (74), Lamy, Polonovski et Rey (150) qui l'ont décrite, signalent des taux faibles de phospholipides et de cholestérol dans les lipides plasmatiques. Les lipides globulaires seraient normaux mais à notre connaissance la répartition des lipides n'a pas été étudiée.

Il n'est pas impossible que l'on soit amené aussi à envisager une anomalie de structure du stroma ou une modification du taux de certains lipides globulaires.

L'étude du métabolisme des lipides globulaires est encore loin d'être connue. L'emploi des isotopes doit permettre d'aller encore plus avant dans l'étude de l'élaboration de ces molécules et des échanges qu'elles peuvent avoir avec le plasma.

Rôle des lipides globulaires.

I) *Propriétés immunochimiques*

La structure lipoprotéique de la membrane globulaire peut être modifiée, nous le verrons, par suite de processus pathologiques affectant les protéines ou les lipides. La fixation de substances chimiques, l'altération ou la dissolution des lipides, des agressions diverses à l'égard du stroma, entraîneront aussi un déséquilibre

lipides-protéines, l'hémolyse et la diffusion à l'extérieur du globule de l'hémoglobine.

Nous étudierons séparément chacun de ces processus.

Les éléments de la membrane globulaire sont susceptibles d'attirer et de fixer de nombreuses substances. Ces substances fixées pourront accoler entre elles plusieurs hématies donnant des aggrégats, c'est le phénomène d'hémagglutination. Ces récepteurs chimiques spécifiques de la membrane sont des « antigènes de groupe » ; ils fixeront soit des anticorps présents dans le milieu ambiant, soit des virus.

On a longtemps ignoré que certains déterminants antigéniques pouvaient être de nature lipidique. Cette question est encore très controversée et de nombreux auteurs n'attribuent ces propriétés qu'aux molécules polysaccharidiques, LANDSTEINER (152), tout particulièrement.

On a pensé cependant à la nature lipidique des antigènes globulaires à la suite des propriétés de solubilité de ces substances.

En traitant les globules rouges par l'alcool, l'activité de groupe est retrouvée dans l'extractum alcoolique a affirmé LANDSTEINER (152). CARTER (41), plus tard, a confirmé la nature lipidique de ces antigènes en les fractionnant par l'acétone et l'éther.

Ce sont surtout KLENK et YAMAKAWA et leurs élèves allemands et japonais qui ont étudié les glucolipides et déterminé leur rôle dans l'agglutination. Ces substances sont spécifiques, et les lipopolysaccharides ont des structures différentes selon les espèces animales envisagées.

NOWOTNY (207-208) a montré que l'enlèvement des lipides de la fraction gluco-lipidoprotidique des globules rouges, entraînait une diminution de son activité antigénique. Il envisage l'origine non glucidique de ces molécules antigéniques, car les substances responsables des groupes A et B sont inactivées par hydrolyse acide ou alcaline, sans altération des associations polyosidiques.

D'autre part, CALVIN (40) recherchant la localisation des facteurs Rh, isole une lipoprotéine, l'élenine, qui

présente les activités A, B, O, Rh. La fraction éthérosoluble de l'élenine, de nature lipidique, présente une importante activité Rh.

Carter (42-43) d'autre part, obtient une agglutination en mettant en contact des glucolipides et des anticorps produits au cours de la mononucléose infectieuse.

L'influence néfaste du froid sur l'hématie entraînant comme l'a montré Lovelock (164) une diffusion des phospholipides et de cholestérol dans le milieu environnant, fait que ces stromas sont devenus incapables, affirme Ducos (75), de fixer les anticorps de groupe.

L'origine lipidique, très probablement glucolipidique, des substances conférant à l'hématie ses propriétés immunochimiques, ne semble plus faire de doute.

Les difficultés qui ont empêché de connaître plus tôt la nature de ces substances antigéniques tiennent sans doute au fait que, pour être isolées, elles doivent être précédées d'une rupture de l'équilibre existant « *in vivo* » entre glucides, lipides et protéines au sein du rempart globulaire.

Tout récemment, Masamune (193), a pu réaliser la synthèse de substances de groupe qui sont des lipopolysaccharides et montrer qu'elles sont d'activité différente selon la nature α et β de l'oside constitutif.

Le rôle des lipides dans le phénomène d'hémagglutination par les virus a été l'objet d'études variées.

Le stroma globulaire peut adsorber de nombreux virus. Les particules de virus ont une fixation sélective en des points bien déterminés de la membrane globulaire. L'agglutination a lieu aussi lorsqu'une particule de virus provoque par accolement l'assemblage de plusieurs hématies. Howe (121) a montré la nature lipoprotéique de la substance réceptrice qui fixe le virus. Ce sont des groupements fonctionnels libres du stroma qui permettent l'union au virus.

La fixation du virus s'effectue progressivement ; une mise en commun de groupements, peut-être des liaisons chimiques, plus ou moins profondes et stables, ont lieu et il n'est pas douteux qu'interviennent aussi des mécanismes enzymatiques.

Il semble donc à peu près établi que les lipides jouent un rôle dans les activités antigéniques et les propriétés d'hémagglutination, sans doute associés à des protéines et à des glucides.

L'intégrité de l'infrastructure des cellules rouges est nécessaire pour justifier de ces propriétés.

II) *Rôle dans l'hémolyse*

Nous avons envisagé la possibilité de fixation des anticorps sur les antigènes de groupe localisés à la surface de l'hématie, la combinaison des virus avec des molécules de la membrane.

De nombreuses substances sont susceptibles de s'unir aussi aux constituants du stroma entraînant pour les cellules l'éclatement de leur rempart et la diffusion vers l'extérieur de l'hémoglobine : c'est l'hémolyse.

La cytolyse peut être due à l'intervention de substances chimiques (saponine, digitonine, sels biliaires, savons, etc...), à l'action du froid ou à des modifications de l'isotonie du milieu ambiant entraînant des phénomènes osmotiques.

Il s'agit pour les substances hémolytiques, d'une action directe sur les lipides (dissolution ou diffusion) ou de modifications de leur métabolisme.

Ces substances seraient adsorbées à la surface du globule ou bien entreraient en combinaison étroite avec les lipides de l'hématie.

L'action directe des agents hémolysants sur les lipides du globule rouge a été mise en évidence par KÖGL et coll. (149) montrant le parallélisme entre la richesse en acide oléique des hématies et leur résistance à l'hémolyse (fig. 17) ; plus le globule rouge est riche en acide oléique, plus l'hémolyse est lente à se produire, moins la membrane se laisse pénétrer par la substance hémolytique (ici le glycérol).

La perméabilité des hématies de diverses espèces animales est en rapport avec leur teneur en acides gras. La présence des doubles liaisons présente un important

retentissement sur la perméabilité, les hématies les plus riches en acides gras insaturés étant les moins perméables.

Toute substance capable de se combiner aux constituants lipidiques de l'hématie, physiquement ou chimiquement, sera susceptible de provoquer l'hémolyse.

On connaît de nombreux exemples d'hémolyse a la suite d'actions physiques.

Figure 17

Comparaison entre la teneur en acide oléique des stromas et leur perméabilité au glycérol d'après Kogl, de Gier, Mulder et Van Deenen (149)

Lovelock (164) a observé une hémolyse en plaçant des hématies au contact d'alumine, l'adsorbant retenant les lipides ou les lipoprotéines de la membrane.

En faisant passer des globules rouges sur une colonne d'hyflo-super-cel, Brown (35) constate aussi une hémolyse.

Les hémolysines des venins de serpents ont aussi une affinité pour les lipides de la membrane globulaire, affirme Turner (273). Les phospholipases de ces venins transformant les lécithines globulaires en lysocithines, produisent la cytolyse.

Ceci explique pourquoi les hématies de certains animaux (mouton, chèvre, bœuf) pauvres en lécithines ou n'en contenant pas du tout, comme l'ont montré TURNER (273) d'une part, BURGER et BEUMER (39), d'autre part, ne sont pas sensibles à l'action de ces venins ou aux toxines de Clostridium Perfringens.

Les lécithines auraient donc une action directe dans le déclenchement de l'hémolyse par les lysocithines.

Ce sont surtout les changements de forme de l'hématie peu avant l'hémolyse et au moment de l'hémolyse qui ont fait songer à une combinaison de l'agent hémolysant avec les constituants du globule rouge.

Nous avons déjà envisagé les différentes formes prises par l'hématie au cours des états prélytiques et lytiques.

KERSTEN et ZUCKER (137), MAC GLONE (175), les premiers, ont rattaché le changement de forme des globules rouges à une modification des lipides du stroma.

PONDER (226) a décrit la déformation de l'hématie sous l'action de saponine qui, se combinant aux lipides

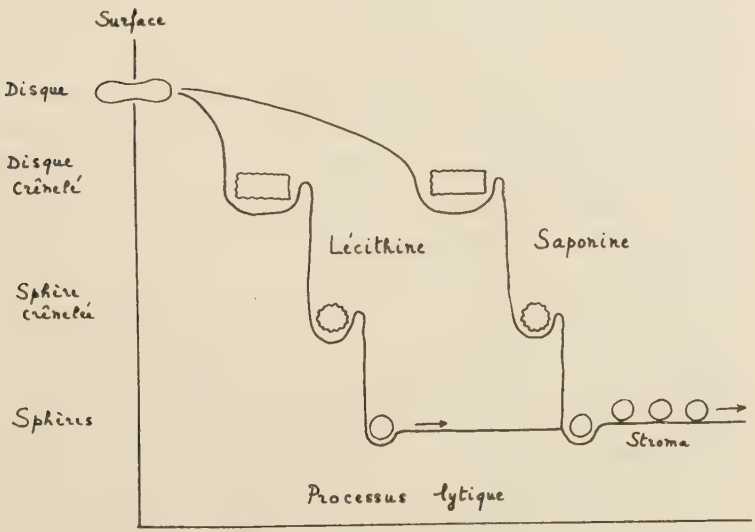

Figure 18

Phénomène de sphération prélytique — Schéma montrant l'apparition de l'aspect crénelé, de la forme sphérique crénelée et du stroma des globules rouges au cours de l'hémolyse par la saponine et par des lécithines selon PONDER (226)

périphériques, produit au début un plissement de la surface. Cette action ne s'effectuant d'abord que de place en place, des dentelures apparaissent puis les excroissances se multiplient lorsque de nouvelles molécules de saponine viennent en contact et finalement la cellule éclate.

Lorsque des hématies, en milieu isotonique, sont additionnées de substances lysantes, elles changent de forme. Le disque biconcave prend un aspect crénelé, s'arrondit, puis éclate.

Ce phénomène a été décrit par MITCHISON (197) et GOUGH (95) qui l'ont expliqué par des modifications de l'arrangement moléculaire à la périphérie du globule rouge.

L'hémolyse par modification de la tonicité du milieu est sans doute à rapprocher de celle provoquée par les agents hémolysants. Nous avons insisté sur les modifications de forme de la membrane globulaire décrites par PONDER, lorsque les hématies sont placées dans des solutions chlorurées sodiques hypotoniques. Ici aussi, ces changements de forme sont dus à des modifications, progressivement plus profondes, dans l'agencement des molécules à la périphérie.

Une preuve certaine de l'affinité des agents hémolysants pour les lipides est l'action néfaste et très rapidement irréversible de ces substances.

Dès qu'elles sont présentes en quantité suffisante pour toucher les lipides globulaires, l'édifice moléculaire est rompu et l'hémolyse se produit.

Il semble incertain que l'éclatement de l'hématie soit précédé comme l'avait affirmé GORTER (94), d'un enveloppement de la cellule toute entière par l'agent néfaste car de nombreuses substances hémolysantes et en particulier saponine et savons, sont actifs à des doses extrêmement faibles.

JUNG (132) et WIEGERSHAUSEN (188) ont montré que la digitonine et l'hexadlecylsufonate de sodium sont hémolytiques à des doses infinitésimales. A des taux aussi faibles, l'agent hémolysant peut difficilement envelopper la cellule.

A l'action lytique de ces substances chimiques nous rattacherons celle des solvants organiques (benzène ou chloroforme) qui dégradent le stroma, comme l'a montré PRANKERD (237) en dissolvant ses lipides.

LOVELOCK (164) décrit le phénomène de l'hémolyse provoqué par le maintien de globule rouge à 0°. A basse température la perméabilité globulaire est augmentée et l'hémolyse se produit par diffusion de lipoprotéines et de lipides. Des températures inférieures à 4° sont donc critiques pour l'hématie et susceptibles de provoquer des modifications de l'état des molécules du stroma.

Les hématies sont d'autant plus sensibles à l'abaissement de température que les différences sont plus importantes, que le choc thermique est plus brutal. Elles seraient protégées en partie contre ce choc thermique par l'adjonction dans le milieu de lécithines.

Ces mécanismes ne sont pas les seuls entraînant une destruction de l'hématie. Les modifications du turnover des lipides globulaires jouent aussi un rôle important. Et toute incidence modifiant l'activité métabolique des lipides des globules rouges peut provoquer l'hémolyse.

LOVELOCK (125), ALTMAN et SWISHER (7) ont observé une importante diminution de la capacité d'incorporation de l'acétate marqué dans les acides gras globulaires après conservation des hématies pendant 4 jours à + 4°.

Les auteurs ont rattaché ce phénomène comme nous le verrons à un arrêt ou à une diminution de la glycolyse.

L'hémolyse surviendrait donc, dès qu'apparaissent une modification de l'état originel des lipides et une perturbation de leur métabolisme.

Les lipides possèdent donc une sensibilité de premier plan dans le phénomène de destruction des hématies. Toute altération de l'équilibre des lipoprotéines du stroma par diffusion des lipides, par affinité de ces molécules pour des substances chimiques et toute modification métabolique, seront suivies d'une rupture de l'enveloppe globulaire et de la sortie de l'hémoglobine.

III) *Rôle dans le transport des ions*

Les phospholipides sont des éléments constants de l'hématie. Ils sont représentés, selon POLONOVSKI (222), par des molécules intégrées très tôt, dès la naissance de la cellule, dans sa structure lipoprotéique et par des molécules, participant à un métabolisme actif et se renouvelant constamment.

Parmi ces dernières les acides phosphatidiques ont une grande place. HOKIN (116-117) mesurant l'activité spécifique des lipides totaux après incorporation de ^{32}P, a montré la très grande incorporation au niveau des acides phosphatidiques et leur grande vitesse de renouvellement.

POLONOVSKI (222), à la suite de HOKIN, décrit un cycle des acides phosphatidiques qui pourrait s'effectuer dans la membrane globulaire.

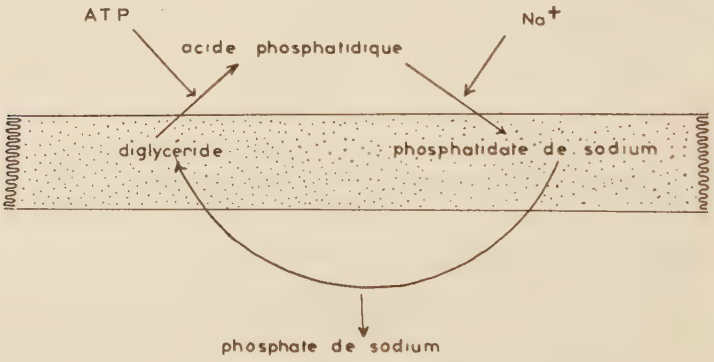

Figure 19

Cycle des acides phosphatidiques
à travers la membrane cellulaire selon HOKIN (117)

A ce niveau, la diglycéride-kinase catalyse, en présence d'ATP, la formation des acides phosphatidiques. Les sels de sodium de ces acides diffuseraient dans la membrane.

L'intervention d'un autre enzyme à l'extérieur de la paroi : la phosphatidate-phosphatase libérerait le phos-

phate disodique en même temps que le diglycéride restant serait réabsorbé dans le globule pour continuer le cycle.

Hokin (116-117) a pensé à l'intervention d'une protéine spécifique pour expliquer la combinaison préférentielle des acides phosphatidiques avec le sodium plutôt qu'avec le potassium.

Nous avons vu que le cycle des acides phosphatidiques entraîne un passage de phosphate de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane. Ce passage doit être complété d'un mécanisme inverse de rentrée dans la cellule du phosphate accompagné d'une pénétration de l'ion potassium.

Yoshida et Nukada (300 *bis*), ont montré par ailleurs que la présence de l'ion potassium augmente notablement l'incorporation de ^{32}P dans les acides phosphatidiques cérébraux.

Un argument supplémentaire à la participation des acides phosphatidiques aux transports ioniques, a été tout récemment apporté par Monnier (198 *bis*, 198 *ter*), par la préparation de modèles synthétiques de membranes vivantes, constituées par de minces films d'alcools gras phosphorylés, imprégnant des feuilles poreuses de polyéthylène. Ces gels sont porteurs de charges électriques positives ou négatives. Placées entre deux solutions de chlorure de potassium de concentration différente, ces membranes permettent le passage des ions et leur perméabilité sélective vis-à-vis des anions et des cations est fonction des charges qu'elles portent.

Ces alcools gras phosphorylés ont des structures très voisines des acides phosphatidiques ; ne possédant pas de glycérol, les acides gras forment des liaisons esters directement avec l'acide phosphorique.

La découverte de ces modèles, apparentés aux membranes cellulaires, semble apporter un nouvel argument en faveur de la participation des acides phosphatidiques, présents dans le rempart lipoprotéique des hématies, au transport actif des ions et des molécules hydrosolubles.

Ce rôle de transport, que l'on reconnaît aujourd'hui aux acides phosphatidiques, au moins pour une grande

part, avait été préalablement attribué aux acétalphosphatides, mais ces lipides sont des composés mineurs de l'hématie.

La proportion relativement importante des céphalines leur avait aussi fait reconnaître une participation possible au mécanisme de transport des électrolytes.

Tout récemment même, BURTON et HOWARD (39 *bis*), ont pensé à un rôle possible des glucolipides dans le contrôle des rapports ioniques intra-extracellulaires, du fait de leur facilité à se lier aux protéines et aux cations.

Nous devons reconnaître que s'il est probable que les acides phosphatidiques jouent ici un rôle essentiel, nous manquons de renseignements quant au rôle possible, dans ce mécanisme, des diverses autres molécules lipidiques.

II - RECHERCHES PERSONNELLES

I - Les Méthodes d'analyse

La structure chimique et les propriétés des lipides dirigent et orientent les méthodes d'analyse qui leur sont appliquées. Les lipides sont insolubles dans l'eau, par contre ils sont très solubles dans la plupart des solvants organiques usuels.

Mais déjà leurs caractères de solubilité dans certains solvants organiques les différencient en plusieurs groupes.

L'acétone dissout les glycérides, les stérides, les acides gras et le cholestérol libres mais les phospholipides (à l'exception des acides phosphatidiques) sont insolubilisés par l'acétone.

Dans l'infrastructure globulaire, si la majorité des lipides est liée sous la forme de cénapses à des protéines, certains sont liés à des radicaux polysaccharidiques. Ces « glucolipides » (cérébrosides, gangliosides, sulfatides...) sont également insolubles dans l'acétone, bien que non phosphorés. Ces lipides complexes, liés à des radicaux de polysaccharides et non plus cénapsés à des protéines, représentent une classe qualitativement importante des lipides globulaires.

D'autre part au sein même du groupe des phospholipides, on doit noter de sensibles différences quant à la solubilité des diverses individualités dans certains solvants organiques. Ainsi, les lécithines sont les plus solubles dans l'éthanol alors que céphalines et sphingomyélines y sont presque insolubles.

Les lécithines saturées et les sphingomyélines sont très solubles dans l'acide acétique et dans l'éthanol et

presque insolubles dans l'éther qui, par contre, dissout les lécithines non saturées.

Les glycérophosphatides en général sont très solubles dans l'éther alors que sphingomyélines et glucolipides sont insolubles.

C'est d'ailleurs sur ces propriétés de plus ou moins grande solubilité dans les solvants polaires et apolaires que sont basées les méthodes physiques d'étude des lipides, en particulier la distribution à contre-courant, la chromatographie sur papier et la chromatographie d'adsorption.

1) LES METHODES D'EXTRACTION DES LIPIDES.

Si une faible partie des lipides peut exister dans le globule rouge à l'état libre nous savons que leur majorité, comme dans le plasma et d'autres tissus, se trouve à l'état de complexes stables que MACHEBŒUF (170-171) a dénommés les « cénapses lipidoprotidiques ».

Ces lipoprotéines constituent la couche périphérique de l'hématie.

Les agents physiques, aussi bien le courant électrique que l'ultracentrifugation, ne sont pas capables de dissocier, à partir des cénapses, les lipides de leur support protéique (172-173). Il faut donc pour rompre les cénapses s'adresser à l'action d'agents chimiques. Certains solvants organiques sont capables de couper ces liaisons, c'est le cas de l'éthanol et du méthanol mais ces solvants ne sont pas en même temps, nous l'avons vu, d'excellents solubilisants de tous les lipides.

Aussi dans l'extraction faut-il leur adjoindre d'autres solvants, tels que l'éther ou le chloroforme qui, s'ils ne sont pas de bons agents de rupture des cénapses sont, par contre, d'excellents solvants globaux.

La plupart des techniques d'extraction associent l'alcool et l'éther, le chloroforme et le méthanol. D'autres méthodes font agir le méthanol à chaud.

L'éthanol, en plus de son rôle de rupture des liaisons est un excellent produit d'extraction car, déshydratant le globule rouge, il facilite la dissolution des lipides dans l'éther, qui serait moindre en présence d'eau.

Nous avons donc surtout utilisé, à la suite de Bloor (25-26), l'association d'alcool et d'éther à froid, la délipidation à chaud ne présentant aucun avantage sur la technique que nous avons appliquée.

Les solvants évaporés, nous reprenons le résidu, non pas seulement par du chloroforme, comme le préconisent Mac Kibbin et Taylor (78) ou Brante (31) mais à la fois par du chloroforme et du méthanol, après nous être rendu compte que le chloroforme seul n'entraînait pas tous les phospholipides que l'on peut enlever par le méthanol au résidu chloroformique.

Cette technique d'extraction a été décrite par Hewitt (112). Elle consiste à précipiter les protéines par l'alcool absolu, à traiter ensuite plusieurs fois ce précipité, pendant des temps suffisants et en triturant bien, avec des mélanges d'alcool et d'éther dont le titre va croissant en éther.

Nous utilisons chaque fois un volume de solvant égal à 10 fois celui des hématies : alcool absolu, puis mélanges d'alcool et d'éther (3 volumes-1 volume ; 1 volume-1 volume ; 1 volume-3 volumes) et enfin éther seul à 3 reprises.

Nous laissons chaque fois 30' en contact à la température du laboratoire, en triturant chaque fois avec une baguette de verre.

Les liqueurs alcoolo-éthérées réunies sont évaporées sous vide à basse température (au-dessous de 40°). Le résidu est repris soit par l'éther de pétrole, soit par un mélange à parties égales de chloroforme et de méthanol.

La dissolution sélective des lipides par l'éther de pétrole est controversée ; Folch (83-84) a montré que ce solvant entraîne de nombreuses substances non lipidiques (acides aminés et urée en particulier).

Artom (8) et Mac Kibbin (178) conseillent de recourir plutôt au chloroforme.

Nous avons, nous-même, préféré utiliser le mélange de chloroforme et de méthanol.

Nous avons d'autre part pratiqué la méthode d'extraction des lipides à froid utilisant le chloroforme et le méthanol (2 vol.-1 vol.) décrite par Polonovski (213). Les

globules rouges sont traités par 10 fois leur volume de ce mélange, laissés au contact une nuit à la température du laboratoire, puis homogénéisés à l'ultra-Turrax. On centrifuge et le culot globulaire est à nouveau traité par le même mélange de solvants à trois reprises pendant 2 heures de contact. Les solvants rassemblés sont filtrés et évaporés sous vide à basse température.

Cette méthode entraîne des substances contaminantes de nature non lipidique, surtout des dérivés hémoglobiniques. Pour éliminer ces composés et surtout les substances d'origine minérale (le phosphore en particulier) il est nécessaire de faire une purification de l'extrait soit par dialyse et électrodialyse, soit selon la méthode de Folch (85).

Un procédé d'extraction un peu différent a été décrit par Reed et Marinetti (243). Nous l'avons utilisé, de préférence, car il permet d'éviter la purification des lipides selon le procédé de Folch.

On opère comme suit :

Les globules rouges lavés au sérum physiologique, sont traités par 5 fois leur volume de méthanol, laissés 15' en contact, bien triturés ; le surnageant est décanté après centrifugation 10' à 5 000 tours/minute. Le culot globulaire est ensuite traité de la même façon par 5 fois son volume de chloroforme, laissé 15' en contact, le surnageant est décanté par centrifugation.

Ces traitements par le méthanol puis le chloroforme sont encore répétés 3 fois. Après cette extraction il reste une poudre constituée par les résidus cellulaires. Les liquides chloroforme-méthanol sont rassemblés, filtrés puis évaporés à sec sous vide à 40°.

Le résidu sec doit encore être épuisé 3 fois pendant 10 min. avec 5 volumes de chloroforme. Nous avons modifié cette technique en utilisant d'abord le méthanol puis 2 fois le chloroforme. Chaque extrait est filtré sur verre fritté de porosité G 3, évaporé à sec dans un ballon taré et pesé à poids constant.

Toutes les évaporations doivent être réalisées à moins de 40°. Les lipides obtenus par notre technique

ne sont que très peu colorés et ne renferment plus les composés bruns hémoglobiniques que renfermait le premier extrait.

Reed et Marinetti (243) éliminent mieux les composés hémoglobiniques, en utilisant pour l'extraction un chloroforme fraîchement distillé.

Le premier extrait chloroforme-méthanol est un mélange contenant à côté des lipides des protéines dénaturées, des dérivés hémoglobiniques et des substances solubles dans l'eau. Cet extrait doit être traité par un solvant anhydre : le chloroforme, pour dissoudre tous les lipides et non les substances annexes le contaminant.

Ce mode d'extraction présenterait l'avantage de n'avoir pas à effectuer la purification selon Folch qui, si elle débarrasse l'extrait de la plupart des substances solubles gênantes, n'enlève pas totalement les dérivés de l'hémoglobine, les extraits restant plus ou moins colorés après la purification. D'autre part la purification au contact de l'eau serait susceptible d'enlever en grande partie des lipides hydrosolubles, en particulier les lysocithines.

Le nombre d'extractions proposé est suffisant, ainsi qu'en témoigne un nouvel épuisement des résidus cellulaires par le chloroforme et le méthanol.

2) PURIFICATION DES EXTRAITS LIPIDIQUES.

Au cours des divers procédés d'extraction, d'autres substances que les lipides ont été entraînées et nous retrouvons dans les extraits : des protéines dénaturées, des dérivés de l'hémoglobine, des peptides, des acides aminés, de l'urée, des glucides et des ions minéraux divers. Les extraits doivent être débarrassés au maximum de ces substances contaminantes et c'est le but de la dialyse, de l'électrodialyse ou de la purification selon le procédé de Folch (85).

A) Dialyse et électrodialyse.

La solution chloroforme-méthanol des lipides est émulsionnée dans l'eau puis dialysée dans un boyau de

cellophane contre eau courante pendant 48 h. et enfin soumise à une électrodialyse (100 volts, 5 mA pendant 3 h. contre tampon véronal de pH = 8,6) dans le but d'éliminer les impuretés azotées présentes à côté des lipides après extraction. L'extrait est ensuite à nouveau évaporé sous vide dans un ballon taré, puis desséché contre du chlorure de calcium ou de l'anhydride phosphorique avant d'être pesé à poids constant.

Les lipides sont alors redissous dans le solvant convenable soit pour la chromatographie sur papier, soit pour la distribution à contre-courant.

B) Purification selon Folch (85).

L'extrait lipidique en solution dans un mélange de chloroforme et de méthanol (2 vol.-1 vol.) est débarrassé des substances contaminantes de nature non lipidique au contact d'une grande quantité d'eau.

La technique est réalisée à 0°, on peut donc exclure à cette température des risques de transformations chimiques des lipides.

On superpose l'eau et l'extrait méthanol-chloroforme en émulsionnant le moins possible. Lorsque l'eau et l'extrait entrent en contact, le méthanol diffuse de l'extrait dans l'eau. Le chloroforme plus lourd reste au fond, une nouvelle couche d'extrait vient se replacer à l'interface eau-solvant.

Il se produit ainsi un renouvellement continu d'extrait frais et d'eau, venant en contact à l'interface tant que le méthanol diffuse de l'extrait dans l'eau. Le résultat obtenu est donc le même que si l'on avait placé une très fine couche d'extrait au contact d'une couche d'eau en perpétuel renouvellement.

A l'équilibration, après 24 h. de contact à 0°, la phase supérieure méthanol-eau est claire, la phase chloroformique inférieure l'est aussi le plus souvent ; à l'interface l'accumulation des substances lipidiques émulsionnées constitue le « fluff ».

Nous réalisons cette purification dans un récipient cylindrique ; l'eau est amenée au contact du solvant, très délicatement, avec une pipette effilée appuyée contre la

paroi du bécher. Celui-ci est ensuite plongé dans un grand récipient rempli d'eau. L'opération terminée on retire le bécher et on enlève le plus d'eau possible par aspiration en s'aidant d'une trompe à vide. Après avoir eu soin de ne pas entamer la couche d'émulsion lipidique on la redissout par addition de méthanol : environ le quart du volume initial de l'extrait, jusqu'à ce que celui-ci soit clair.

Cet extrait est ensuite évaporé à sec dans un ballon taré, sous vide, à 37°.

3) LES METHODES D'ANALYSE PROPREMENT DITES.

A - Méthodes physiques

L'analyse des lipides peut-être effectuée sur l'extrait lipidique total ou sur des fractions isolées de cet extrait. Nous avons utilisé à cet effet, les méthodes de séparation habituelles des lipides c'est-à-dire d'une part la précipitation des phospholipides par l'acétone et d'autre part l'élution sélective de diverses classes de lipides par des solvants organiques sur une colonne d'acide silicique.

a) Isolement des lipides.

1 - *Par l'acétone :*

Pour isoler les phospholipides nous avons mis à profit leur précipitation acétonique à basse température. Lorsqu'on épuise l'extrait lipidique total à —10° par l'acétone anhydre (déshydratée sur sulfate de sodium anhydre) on entraîne les glycérides et stérides, alors que les phospholipides sont insolubilisés.

Cette méthode a permis à Bloor (27) et à Boyd (29) de précipiter les phospholipides pour leur étude individuelle par une solution alcoolique de chlorure de magnésium et par l'acétone.

Nous avons suivi la technique que décrit Polonovski (221) pour le fractionnement des lipides plasmatiques. L'extrait lipidique total, évaporé à sec, est dissous dans

une très petite quantité d'un mélange de chloroforme et de méthanol (1 vol.-1 vol.) puis additionné d'un grand volume d'acétone anhydre et abandonné 5 heures à —10°.

Le résidu des lipides phosphorés est séparé par filtration sur verre fritté G$_3$. Le précipité recueilli est mis en contact à deux nouvelles reprises avec de l'acétone pendant 1 heure à —10°.

Chaque fois le résidu est filtré.

La solution acétonique est alors concentrée ; de son côté le précipité est dissous dans un mélange à parties égales de chloroforme et de méthanol, filtré et évaporé avant d'être pesé.

Mais ce fractionnement par l'acétone en lipides solubles (glycérides, stérides, cholestérol, acides gras) et en lipides insolubles (phosphatides) a été l'objet de nombreuses critiques.

Si la précipitation des phospholipides est totale par l'acétone et par une solution alcoolique de chlorure de magnésium, comme l'affirment Sinclair et Dolan (260), le précipité entraîne une petite quantité de glycérides et d'acides gras libres.

D'un autre côté, il apparaît que l'acétone entraîne en solution une petite partie de phospholipides. Borgström (29) confirme une perte de phosphatides au cours de la purification acétonique.

Barron et Hanahan (14) ont retrouvé 4 % de phospholipides dans la fraction des lipides neutres de foie de rat, solubilisée par l'acétone.

Favarger (80), retrouverait même de 8 à 15 % de phospholipides dissous par l'acétone avec les glycérides.

2 - *Sur colonne d'acide silicique :*

Borgström affirme que la séparation des phosphatides et des lipides neutres serait plus complète par chromatographie sur acide silicique.

Aussi, de préférence à la purification acétonique, avons-nous fractionné l'extrait lipidique total sur colonne d'acide silicique selon la technique décrite par Borgström (29) et par Marinetti (185, 190).

Nous utilisons une colonne de 1 cm de diamètre dans laquelle est versé de l'acide silicique MALLINCKRODT (100 mesh), activé par passage 24 heures à l'étuve à 100°, à raison de 50 fois le poids de lipides à fractionner. La colonne est longuement lavée au méthanol pour éliminer les fines particules d'acide silicique puis à l'éther de pétrole et au chloroforme.

Les lipides totaux sont placés sur la colonne en solution chloroformique ; une première élution par le chloroforme entraîne les glycérides, les stérides, le cholestérol et les acides gras libres.

Une deuxième élution d'abord par un mélange de chloroforme et de méthanol (1 vol.-1 vol.) puis par le méthanol seul, élue la totalité des phospholipides.

Cette technique, de réalisation plus facile, nous a également donné de meilleures séparations que le fractionnement par l'acétone.

b) DIFFÉRENTES MÉTHODES UTILISÉES.

Les méthodes physiques d'analyse, d'emploi relativement récent, sont en pleine évolution. Nous avons retenu :

— la chromatographie sur papier,
— la distribution à contre-courant,
— la chromatographie d'adsorption,
— l'électrophorèse sur papier,
— d'autres méthodes (spectographie infra-rouge).

Nous ferons ici une description sommaire de ces différentes méthodes dont l'application représente une partie importante de notre travail personnel.

I - Chromatographie sur papier à contre courant

La chromatographie sur papier a pris depuis quelques années une grande extension dans tous les domaines; d'exécution relativement facile, elle apporte en général d'excellents résultats pour le fractionnement de mé-

langes complexes de substances. Son application à l'étude des lipides a été particulièrement fructueuse.

Nous avons appliqué ici un système de chromatographie sur papier particulier qui a pour but d'obtenir un partage des substances entre deux phases de solvants organiques non miscibles, l'une dite « légère » ascendante, l'autre « lourde » descendante. Suivant leurs solubilités respectives, les divers lipides d'un mélange soumis à ce système de chromatographie seront entraînés par l'une ou l'autre phase.

Cette technique déjà appliquée au fractionnement des lipides plasmatiques par Douste-Blazy, Polonovski et Valdiguié (66, 67, 68, 70, 220), nous a permis de séparer les lipides non phosphorés des phospholipides et de fractionner ces derniers.

C'est une chromatographie unimensionnelle où la bande de papier trempe par chacune de ses extrémités dans l'une des deux phases du mélange des solvants.

Nous décrirons successivement :

La technique suivie :

1. - L'appareillage,
2. - La marche de la chromatographie,
3. - Les solvants,
4. - Les méthodes de coloration des chromatogrammes,
5. - Calcul des Rf.

TECHNIQUE.

1. - L'appareillage.

L'appareil se compose de deux tubes de diamètre différent emboîtés l'un dans l'autre, l'étanchéité de l'ensemble est assurée par des rodages.

Le grand tube de 45 cm de long et 8 cm de diamètre contient la phase légère, alors que la phase lourde est placée dans le petit tube intérieur ayant les dimensions d'un tube à essai ordinaire.

Le dépôt de la tache lipidique est fait dans la partie supérieure de la bande en C ; les bandes de papier sont

de 30 cm de long, leur largeur de 2 cm est ramenée à 1 cm dans le quart supérieur pour permettre leur introduction dans le petit orifice du tube supérieur.

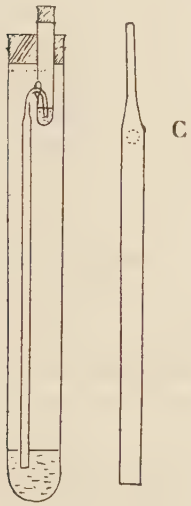

Figure 20

Schéma de notre appareil de chromatographie sur papier à contre-courant

Nous utilisons essentiellement le papier Whatman n° 1.

Il est nécessaire de s'assurer, pendant tout le temps que dure la chromatographie, que le système reste parfaitement vertical et à cet effet la colonne est maintenue droite par fixation à un support rigide.

2. - Marche de la chromatographie.

Les bandes de papier sont découpées aux dimensions indiquées. Les lipides sont déposés sur le papier en C à l'état d'un extrait alcoolo-éthéré préparé selon une technique dérivée du procédé de Hewitt (112), à raison de 50 à 200 µg, de lipides (selon la nature des lipides que nous voulons révéler et selon la sensibilité des réactifs utilisés), au moyen d'une micropipette.

Il est recommandé, pour obtenir un meilleur fractionnement des substances, de déposer les lipides en une seule fois, en laissant le papier aspirer le solvant organique. L'idéal sera donc de choisir, pour effectuer ce dépôt, un solvant ou un mélange de solvants s'évaporant le plus rapidement possible à la température ordinaire.

Dans ce but, Marinetti recommande de redissoudre, après l'extraction, les lipides dans un mélange à parties égales de benzène et d'alcool isoamylique (1 vol.-1 vol.) qui constitue à la fois un bon solvant des mélanges de lipides et un couple favorable pour un dépôt régulier sur le papier.

C'est cette technique que nous avons utilisée.

Dans le grand tube la bande plonge dans quelques ml du solvant léger par sa partie inférieure ; le haut de la bande est maintenu dans l'orifice du petit tube par sa partie rétrécie.

On laisse s'élever le solvant léger sur le papier (on peut accélérer son ascension en arrosant à la pipette la moitié inférieure de la bande). Dès que le solvant léger atteint la tache de dépôt, on verse dans le petit tube la phase lourde à l'aide d'une pipette jusqu'à 1/2 cm au-dessous de l'orifice (il faut prendre la précaution de faire écouler le solvant lourd très lentement sur les parois du tube sans mouiller la bande).

La rencontre des deux solvants doit s'opérer juste au-dessus du dépôt des lipides. La chromatographie est terminée lorsque le solvant lourd descendant, ayant parcouru la quasi totalité de la bande, arrive presque au contact de la phase légère déposée au fond du grand tube. Cette limite ne pouvant être distinguée dans le tube, la chromatographie est arrêtée après 8 heures de migration à 18-20 degrés. La bande est enlevée de la colonne, on marque au crayon la limite inférieure de parcours du solvant lourd et on sèche 10 minutes à l'étuve à 60-70 degrés avant de la révéler.

La progression de chacune des deux phases de solvants en fonction du temps a pu être suivie à l'aide de substances colorantes appropriées (Douste-Blazy (67). Cet artifice permet de constater que lorsque la phase légère est arrivée en haut de la bande et dès que l'on introduit la phase lourde, elle est repoussée par la phase acétique.

Dans cette chromatographie la température joue un rôle, en ce sens que la phase légère progresse plus rapidement lorsque la température s'élève. A 37° la phase légère parcourt même un petit trajet au-dessus du point de rencontre avec la phase acétique.

Le sens de la progression des solvants a peu d'importance, ainsi on peut inverser la place des deux phases (solvant lourd en bas, solvant léger en haut) le phénomène reste identique. Ce procédé n'est cependant pas

applicable dans notre cas car en fin de chromatographie, lorsque le papier est enlevé de la cuve, on ne peut pas voir la limite inférieure de progression du solvant léger.

Que va-t-il se passer lorsqu'à l'aide de ce système nous voudrons séparer les divers lipides d'un extrait ? Les lipides solubles dans l'éther de pétrole et insolubles dans l'acide acétique resteront au niveau de rencontre des deux phases ; les lipides qui seront solubles seulement dans la phase lourde seront entraînés par celle-ci ; les lipides qui seront solubles à la fois dans les deux phases seront disposés sur la bande d'après leur coefficient de partage.

En réalité le phénomène est rendu un peu plus complexe du fait que certaines substances seront plus ou moins adsorbées sur le papier.

3. - Les solvants.

Comme nous l'avons dit, en envisageant le problème de l'extraction des lipides, le choix des solvants à utiliser découle des propriétés de solubilité des divers lipides de l'extrait à fractionner. Des mélanges de solvants polaires et apolaires, non miscibles entre eux se sont révélés les meilleurs.

Pour réaliser la saturation complète des deux phases de solvants, les deux couples sont mis en contact dans une ampoule à décantation 24 heures au moins avant de réaliser la chromatographie.

Nous avons choisi parmi les solvants polaires : le méthanol, l'acide acétique, et dans le groupe des solvants apolaires : l'éther de pétrole, l'heptane, le chloroforme. La présence d'une toute petite quantité d'eau permet la séparation des deux phases de solvants polaires et apolaires. L'adjonction d'eau, d'acétone ou de chloroforme diminue la solubilité de certains lipides dans la phase hydrophile et l'augmente dans la phase légère.

De nombreux couples de solvants ont été étudiés, chacun ayant été appliqué au fractionnement de certains mélanges lipidiques. Parmi eux, Douste-Blazy (220) en a retenu 5 groupes différents qu'il a réservés, d'une part, à

l'étude de phospholipides témoins purifiés et d'autre part, au fractionnement de lipides plasmatiques.

Dans ces divers couples de solvants nous retrouvons toujours au moins un élément polaire (méthanol ou acide acétique) parfois même, les deux, et deux éléments apolaires (éther de pétrole, heptane ou chloroforme) en proportions variables.

Pour séparer les deux phases, il faut ajouter de 1 à 5 % d'eau (au-delà de 10 % d'eau le chloroforme n'entraîne plus les phospholipides). Inversement s'il y a moins de 1 % d'eau la séparation des deux phases ne s'effectue pas.

Lorsque la phase légère contient de l'éther de pétrole la proportion d'eau doit être de 1 pour 50 de ce solvant.

Dans le vaste champ de séquences de solvants utilisé par DOUSTE-BLAZY (27), nous avons retenu pour notre étude personnelle un mélange de méthanol, acide acétique, eau, éther de pétrole et chloroforme où le méthanol et l'acide acétique constituent la phase polaire. Sa composition est la suivante :

Acide acétique	21,6
Méthanol	21,6
Eau	2,2
Ether de pétrole	45,5
Chloroforme	9,1 (en volumes)

Pour que ces solvants ne se mélangent pas, en plus de la présence d'un peu d'eau, il faut que le couple renferme un volume d'éther de pétrole au moins double de celui de méthanol et une quantité de chloroforme inférieure à 60 volumes.

On obtient de bons fractionnements en remplaçant dans ce couple le méthanol par le méthylal et l'acide acétique par l'acide propionique.

C'est le couple de solvants décrit plus haut qui nous a donné les meilleurs résultats.

4. - COLORATION DES CHROMATOGRAMMES.

Après avoir éliminé les dernières traces de solvant par un séchage de 5 à 10 minutes à l'étuve à 60-70°, nous

pratiquons diverses techniques de coloration. Nous révélons les lipides en général par la technique au Soudan Noir B conseillée par SWAHN (264) et par HAAG (98) : le noir Cérol B en solution dans l'éthanol à 50° colore les lipides en bleu-noir ; il présente sur le Soudan III, également utilisé, l'avantage de teinter également tous les lipides.

Cependant BISERTE et HAVEZ (24) notent quelques différences dans l'affinité du colorant avec ses divers substrats. Ainsi les graisses neutres et les esters du cholestérol prennent intensément le colorant, les lécithines le prennent modérément, par contre le cholestérol et l'acide oléique libre, le prennent très peu.

Le mécanisme de la coloration par le Noir Soudan n'est pas absolument défini et selon BISERTE et HAVEZ nous ne serions pas en présence d'une réaction chimique mais le colorant serait simplement dissous physiquement par les lipides et adsorbé par eux. On n'est cependant pas absolument certain de la formation de ce complexe physique, aussi la spécificité de cette coloration est-elle parfois mise en doute.

La préparation d'un Noir Soudan vraiment actif nécessite quelques soins. Nous consignons ici les détails de notre technique de préparation.

100 mg de Noir Soudan MERCK sont introduits dans un erlenmeyer propre et sec (rincé à l'éther) ; on ajoute 100 ml d'éthanol à 50°, on chauffe au bain-marie bouillant en agitant constamment jusqu'à franche ébullition que l'on maintient de 1 à 2 min.

Le récipient est bouché avec un tampon de coton pour éviter l'évaporation de l'alcool ; on refroidit sous eau courante. Cette solution qui renferme quelques grains de colorant non dissous est filtrée trois fois sur un double filtre plissé DURRIEUX sans graisse.

On ajoute ensuite au filtrat 100 ml. d'éthanol à 50°. Lors de la filtration on couvre l'entonnoir pour éviter l'évaporation de l'alcool.

Ce réactif est instable ; même au réfrigérateur il s'altère en deux ou trois jours. Nous le renouvelons avant chaque utilisation.

Groulade (96) affirme que l'on obtient les meilleurs résultats en faisant bouillir la solution pendant 45 minutes en opérant dans un ballon rodé surmonté d'un réfrigérant à reflux pour éviter les variations du taux de l'éthanol.

D'après cet auteur l'ébullition est indispensable, elle fournit une solution exempte de toute suspension colloïdale de Noir Soudan.

Pour la coloration, les chromatogrammes secs sont plongés pendant 45 min. dans la solution de Noir Soudan B dans l'alcool à 50°, puis rapidement lavés selon Swahn (264) dans deux bains successifs d'alcool à 50° et enfin, séchés à l'air par suspension pour éviter la formation d'auréoles sur le papier.

Tous les auteurs ne sont pas absolument d'accord sur le temps de coloration et sur la nécessité ou non de pratiquer, en sortant les bandes de Noir Soudan, un ou plusieurs lavages par l'alcool à 50°.

Biserte et Havez (24) recommandent, pour cette coloration, l'emploi d'un récipient clos ; ces auteurs affirment que l'intensité optimum de coloration n'est obtenue qu'après 3 heures de contact et ils préconisent, après la coloration, trois lavages des bandes par l'éthanol à 50°, après avoir constaté que ce procédé ne reprend aux lipides qu'une quantité insignifiante de colorant.

Paysant (212) recommande, comme les précédents auteurs, 3 heures de contact avec le colorant puis trois lavages successifs de 15 min. chacun dans l'éthanol à 50° pour décolorer le fond du papier.

D'autres auteurs utilisent des temps de contact plus longs, allant jusqu'à 12 heures.

Par opposition à ces auteurs, qui préconisent de laver les bandes après coloration, Groulade (96) conseille de supprimer de la technique originelle de Swahn ces lavages à l'alcool qui, s'ils rendent plus clair le fond de bande, entraînent une grande altération de la coloration, empêchant notamment pour les lipoprotéines des déterminations quantitatives.

Le colorant n'étant que dissous dans les lipides ou les lipoprotéines, un rinçage même rapide élue partiellement le Noir Soudan.

Nous avons nous-même adopté une technique intermédiaire ; les chromatogrammes, après coloration, sont rincés très rapidement dans deux bains d'alcool à 50°, parfois même avons-nous banni tout lavage.

Les techniques de révélation du phosphore, de la choline, des acides aminés, du cholestérol et des acétal-phosphatides sont décrites plus loin.

5. - Calcul du Rf.

Son calcul dans la méthode de chromatographie que nous venons de décrire est arbitraire. Nous prenons comme origine non plus, comme dans toute chromatographie, le point de dépôt des lipides, mais le point de rencontre des deux phases de solvants.

Dans ce système les lipides éthéro-solubles auront donc un Rf égal à 0.

Le Rf que nous indiquons pour les phospholipides ne correspond pas exactement au coefficient de partage, puisque, nous l'avons dit, l'adsorption sur le papier joue un certain rôle.

Figure 21

Désignons par AB la ligne de rencontre des deux phases au-dessus de la tache de dépôt T des lipides et par DE le front du solvant lourd, à la fin de la chromatographie. Supposons que nous ayons révélé deux taches T_1 et T_2, l'une entraînée par la phase légère, l'autre par la phase lourde.

— le Rf de T_1 insoluble dans la phase lourde sera égal à 0 ;

— le Rf de T_2 entraînée par la phase lourde sera : $\frac{T_1\ T_2}{T_1\ M}$.

Bien que ce Rf ne soit pas déterminé selon les techniques classiques, il permet cependant l'identification des individualités lipidiques fractionnées.

2 - Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique

En plus de la chromatographie sur papier à contre-courant, que nous venons de décrire, nous avons donné la place la plus grande à la chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique. Nous décrirons en détail les conditions dans lesquelles nous l'avons appliquée.

La chromatographie des phospholipides, réalisée à l'origine sur des papiers non traités n'apportait que des résultats limités ; elle nécessitait l'emploi de solvants fortement polaires.

Marinetti et ses collaborateurs (247) l'ont utilisée et longuement décrite.

L'acylation préalable des phosphatides permettait à Marinetti et Stotz (183) d'obtenir une meilleure séparation chromatographique des phosphatidylcholines, des phosphatidyléthanolamines et des phosphatidylsérines.

Lorsque Rathmann (242) obtint de bons résultats en fractionnant des lipides sur colonne d'acide silicique, on imagina une technique d'imprégnation des papiers de chromatographie par un gel d'acide silicique. Lea, Rhodes et Stoll (157), Reiser et Dieckert (63) les premiers fractionnèrent des lipides sur de tels papiers. En utilisant un mélange de chloroforme et de méthanol ils séparaient des lécithines, des céphalines et des lysocithines mais n'obtenaient pas un fractionnement convenable des sphingomyélines et des lécithines. De plus dans ce solvant les inositolphosphatides et les acétalphosphatides restaient au point de départ.

En ajoutant cependant un peu d'eau (2 % environ) au mélange de chloroforme et de méthanol (3 vol.-1 vol.) ils obtenaient une meilleure séparation des sphingomyélines et des lécithines et ce solvant entraînait convenablement les inositolphosphatides et les acétalphosphatides.

De son côté Smith (252 *bis*) réalisait par chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique, dans un mélange de chloroforme et de méthanol une bonne séparation des phospholipides de lipoprotéines sériques ; il

mettait en évidence des lysocithines, des sphingomyélines, des lécithines et des céphalines.

MARINETTI et ses collaborateurs (247) permirent quelques années plus tard de grands progrès dans l'utilisation de ce type de chromatographie, grâce a une étude détaillée des conditions de partage, de la préparation des papiers et de l'emploi de divers mélanges solvants.

L'utilisation dans ces couples de solvants de la 2-6 diméthyl-4 heptanone et de diverses autres cétones grasses améliore grandement la méthode.

MARINETTI (192-184-185) a décrit en détail de nombreuses méthodes d'étude des lipides ; nous avons utilisé pour nos recherches personnelles quelques-unes d'entre elles.

De nombreux auteurs, en particulier TURNER (274), attribuent à la chromatographie sur papier imprégné, un pouvoir de séparation des lipides meilleur que celui accordé à la chromatographie sur colonne d'acide silicique.

Si cette dernière en effet ne sépare qu'imparfaitement les sphingomyélines des lécithines, quels que soient les couples de solvants utilisés, par chromatographie sur papier imprégné ces deux phosphatides sont toujours bien distincts l'un de l'autre.

Nous décrivons ici notre technique d'imprégnation des papiers et notre technique chromatographique.

1 - *Imprégnation des papiers :*

C'est une opération délicate et minutieuse qui consiste à tremper les feuilles dans des bains successifs de silicate de sodium et d'acide chlorhydrique qui fixe sur le papier un gel d'acide silicique.

Notre technique d'imprégnation suit les détails indiqués par LEA et RHODES (158), par MARINETTI (185) et par POLONOVSKI (221).

Les feuilles de papier Whatman n° 1, découpées aux dimensions voulues (40 × 42 cm) sont fixées sur un cadre de baguettes de verre. Elles sont alors plongées pendant 5 minutes dans un bain de silicate de sodium

(36° B) à 50 %, égouttées par suspension puis plongées pendant 5 minutes dans un bain d'acide chlorhydrique 6N.

L'excès d'acide chlorhydrique est éliminé par lavage des feuilles dans une grande cuve, contre eau courante, jusqu'à ce que les eaux de lavage ne présentent plus de réaction acide.

Les feuilles sont alors suspendues, séchées à l'air libre puis complètement déshydratées par un bref passage à l'étuve à 100°.

Avant chaque chromatographie, l'acide silicique est activé par un nouveau et bref passage à l'étuve à 100°.

Diverses variantes ont été proposées pour améliorer la préparation de papiers. Récemment Reed et Marinetti (243) ont obtenu une meilleure imprégnation en préparant le silicate de sodium par action lente de soude 3,7 N à raison de deux litres sur 310 g d'acide silicique Mallinckrodt (100 mesh). Cette solution stock est passée sur un filtre Whatman n° 42 sous vide partiel, sa densité est ajustée avec un peu d'eau à 1,200-1,210.

Cinq cent ml. de cette solution servent à imprégner 16 feuilles.

Les opérations suivantes sont les mêmes.

Marinetti (184) a aussi proposé des temps plus longs de contact avec l'acide chlorhydrique, allant jusqu'à 30 minutes.

Cormier et Jouan (49) ont conseillé l'utilisation d'une solution de silicate de sodium concentrée (36-40° B) diluée à 75 %. Un litre de solution est nécessaire pour imprégner 12 feuilles. La solution d'acide chlorhydrique 5N, préparée en diluant au demi avec de l'eau distillée, l'acide chlorhydrique fumant RP (de D = 1,19) est renouvelée après imprégnation de 6 feuilles.

2 - *Matériel* :

Nos chambres de chromatographie sont des colonnes cylindriques de 45 cm de haut et de 25 cm de diamètre. Les cuves sont recouvertes d'un manchon de papier sombre pour éviter toute action de la lumière.

Le solvant est placé au fond de la cuve, les feuilles enroulées en cylindre sont posées verticalement.

Nos chromatographies sont réalisées à 22°, en chambre climatisée.

3 - *Les solvants :*

Nous plaçons les solvants au moins 24 heures à l'avance dans la cuve afin de saturer l'enceinte.

Etant donné les bons résultats obtenus pour le fractionnement des lipides sur papier imprégné, avec des solvants contenant de la diisobutylcétone, nous utilisons un des mélanges décrit par MARINETTI (188) dont la composition est la suivante :

2.6 diméthyl 4 heptanone . . .	40 vol.
Acide acétique	25 vol.
Eau	5 vol.

La chromatographie est ascendante ; à 22° en chambre climatisée, elle dure de 18 à 20 heures.

Ce système de solvants nous a permis de séparer entre eux les phosphatides ; parmi d'autres types de mélanges indiqués par MARINETTI, c'est celui qui nous a donné les meilleurs résultats.

La chromatographie ascendante sur papier non imprégné dans le solvant : diisobutylcétone-acide acétique (30-5), que nous avons également essayée, fractionne les phospholipides mais ne permet pas des séparations aussi fines que la technique détaillée ci-dessus.

Sur papier imprégné d'acide silicique également, nous avons pu séparer entre eux divers lipides non phosphorés des hématies, en utilisant un mélange de solvants décrit par MARINETTI (190) pour la chromatographie des lipides de cœur de porc. Sa composition est la suivante :

Diisobutylcétone	6 vol.
Heptane	96 vol.

La chromatographie est également ascendante ; réalisée à 22° en chambre climatisée, elle demande de 4 à 5 heures.

4 - *Coloration des chromatogrammes.*

Nous effectuons les chromatographies sur papier en déposant sur chaque piste 150 à 200 µg. de lipides ou une quantité correspondant à 5 ou 10 µg. de phosphore.

Pour le dépôt, les lipides sont mis en solution dans un mélange d'alcool isoamylique et de benzène (1 vol.-1 vol.) recommandé par MARINETTI (184).

Le développement de la chromatographie terminé, les feuilles sont débarrassées des dernières traces de solvants par un séjour de 10 min. à l'étuve à 100°.

a) Lipides en général

Les lipides sont alors révélés par immersion des feuilles 20 min. dans une solution aqueuse de Rhodamine 6G à 0,001 g. par litre.

Les chromatogrammes sont ensuite longuement lavés sous eau courante pour éliminer l'excès de colorant. Les feuilles, une fois sèches, sont observées en lumière ultra-violette où les lipides montrent des taches fluorescentes de coloration variables (jaune, orangées, roses, bleutées...) suivant leur nature.

Cette méthode de coloration, aujourd'hui largement utilisée, a été décrite pour la première fois par MARINETTI.

Nous utilisons aussi une coloration plus rapide mentionnée par REED (243) qui consiste à tremper les feuilles seulement 1 min. dans une solution de Rhodamine 6G à 0,012 g. par litre.

Les lipides localisés en lumière ultra-violette, sont cerclés au crayon car les taches se modifient parfois avec le temps.

Il est préférable de sécher les feuilles par suspension à l'air pour éviter la formation d'auréoles. Si les taches fluorescentes correspondant aux phospholipides sont bien visibles sur les chromatogrammes humides ou plongés dans l'eau, qui peut les conserver quelques jours, il est, par contre préférable d'observer les chromatogrammes de lipides non phosphorés après séchage à l'air.

b) Composés choliniques

Les composés choliniques (lécithines, lysolécithines, sphingomyélines) sont révélés par une technique décrite par CHARGAFF (45). Les chromatogrammes secs sont plongés dans une solution d'acide phosphomolybdique à 2 % dans l'eau distillée pendant 15 min, ils sont ensuite longtemps lavés sous eau courante pour éliminer l'acide phosphomolybdique non retenu par les lipides (il faut laver plusieurs heures pour obtenir de bons contrastes). La réduction du complexe phosphomolybdique est réalisée en trempant les chromatogrammes dans une solution de chlorure stanneux à 1 % dans l'eau ou dans Hcl 3N.

Les lipides choliniques apparaissent en bleu sur fond blanc.

Nous avons également employé pour révéler les lipides choliniques la technique préconisée par POLONOVSKI (213) qui consiste à immerger les bandes dans une solution de DRAGGENDORFF-BREGOFF (244), qui révèle ces lipides sous la forme de spots jaune orangés sur un fond jaune clair.

c) Composés phosphorés

Le phosphore lipidique est décélé sur papier selon la méthode décrite par HANES et ISHERWOOD (106). Les bandes séchées à l'étuve à 70° sont pulvérisées avec la solution préparée comme suit :

Acide perchlorique à 60 % ..	5 ml.
Hcl N	10 ml.
Molybdate d'ammonium à 4 %	25 ml.
Eau .. .. q.s.p.	100 ml.

Les papiers sont alors laissés en lumière faible, les taches phosphorées apparaissent en bleu sur fond blanc. Il est préférable avant la coloration de fixer les bandes en les trempant 3 min. dans une solution de sublimé à 1 %, les feuilles étant ensuite lavées et séchées.

d) Groupements aminés

Les groupements aminés des céphalines sont révélés par pulvérisation de ninhydrine à 0,1 % dans le butanol

saturé d'eau. Les bandes étant ensuite séchées à l'étuve à 70° pendant quelques minutes, les groupements aminés apparaissent en spots violets.

e) Cholestérol et stérides

Par pulvérisation d'acide silico-tungstique ou silicomolybdique en solution à 10 % dans l'éthanol puis passage 2 min. à l'étuve à 70° on colore en pourpre et en vert le cholestérol et les stérides.

Nous avons préféré utiliser pour révéler le cholestérol et les stérides une techniqe plus spécifique dérivée de la réaction de LIEBERMAN-BURCHARD et appliquée à la chromatographie sur papier. Pour cela nous trempons les chromatogrammes secs dans un mélange (4 p.-1 p.) d'anhydride acétique et d'acide sulfurique. La coloration verte apparaît très rapidement et reste stable une vingtaine de minutes. Dans ces conditions la conservation des papiers n'est pas possible au-delà de 30 min. environ.

La proportion de 1 p. d'acide sulfurique pour 4 p. d'anhydride acétique ne peut-être dépassée car les papiers sont détruits dès l'immersion. Cette méthode de coloration nous a donné de très bons résultats.

f) Acétal phosphatides

De préférence à l'utilisation du réactif de SCHIFF, nous avons révélé sur les chromatogrammes les acétal-phosphatides par immersion quelques minutes dans une solution alcoolique de 2-4 dinitrophénylhydrazine (DN PH) qui les colore en orangé sur fond jaune, selon la technique décrite par HACK (100).

5 - *Mise en évidence des composés hémolytiques.*

Grâce à une technique particulière décrite par VALDIGUIÉ et DOUSTE-BLAZY (277) nous avons recherché la présence de constituants à propriétés hémolytiques. Cette recherche est effectuée soit en ajoutant une goutte de globules rouges de mouton lavés au résidu lipidique repris par du sérum physiologique, soit en déposant une

goutte de solution lipidique sur un papier filtre placé dans une boîte de Pétri de gélose de sang.

La présence de composés hémolytiques se traduit au bout de quelques heures par l'apparition d'un halo d'hémolyse tout autour de la tache.

Nous signalerons que la chromatographie sur papier peut aussi être appliquée à l'étude des produits d'hydrolyse des lipides.

L'hydrolyse chlorhydrique des phospholipides à 100° pendant 24 heures libère leurs constituants azotés : choline, éthanolamine et sérine, qui après chromatographie unidimensionnelle dans le phénol ou le butanol normal, selon des techniques décrites par BRANTE (32), CHARGAFF (45), LEVINE et CHARGAFF (159), sont révélées par coloration au phosphomolybdate et chlorure stanneux ou à la ninhydrine.

LEVINE et CHARGAFF (160) réalisent même le dosage de ces constituants en mesurant l'intensité de coloration des spots sur les chromatogrammes.

HACK (101) estime la choline en appréciant la coloration des chromatogrammes après combinaison avec le sel de Reinecke.

D'autre part GERTLER (90) fait une estimation colorimétrique des acides aminés colorés à la ninhydrine par élution des spots par la pyridine, suivie de lecture photométrique.

3 - Chromatographie sur colonne

D'emploi très large aujourd'hui, le fractionnement sur colonne d'acide silicique permet la séparation de diverses classes de lipides grâce à l'utilisation combinée de solvants organiques différents.

Nous avons déjà mentionné comment BORGSTRÖM (28) sépare sur acide silicique les phospholipides des graisses neutres de foie de rat.

Sur acide silicique aussi, BORGSTRÖM (29) fractionne à partir d'un mélange de lipides non phosphorés : les glycérides, les esters de cholestérol, les acides gras et le cholestérol libres.

Barron et Hanahan (14) ont réalisé une étude similaire sur des lipides neutres de foie de rat.

Ce mode de fractionnement a été également décrit par Trappe (269-270-271) et par Kathen (134) qui utilisent un acide silicique activé et des mélanges éluants constitués d'éther de pétrole et de benzène.

Mac Kibbin et Taylor (179) ont fractionné à partir de lipides de foie, les phospholipides sur un mélange d'acide silicique et de célite.

La chromatographie sur colonne de cellulose permet de séparer les lipides, selon Bevan (23), de leurs impuretés azotées, acides aminés, peptides...

Nous avons, nous-mêmes, parfois, utilisé ce procédé à côté de la purification par dialyse.

1 - *Fractionnement des phospholipides.*

Nous utilisons l'acide silicique Mallinckrodt (100 mesh), activé par chauffage à 110° pendant 24 heures. Nous le mélangeons à du méthanol dans un bécher et enlevons les particules les plus fines par décantation du liquide surnageant à plusieurs reprises.

Acide silicique et méthanol sont ensuite versés sur la colonne qui est lavée par passage d'un important volume de méthanol.

Nous lavons ensuite l'acide silicique par l'éther de pétrole puis par le chloroforme.

Nos colonnes ont 18 cm de haut et 1 cm de diamètre.

La quantité d'acide silicique doit être de 50 fois le poids de phospholipides à fractionner.

On a recommandé l'addition d'hyflo-supercel à l'acide silicique à raison de 1 partie pour 2 parties d'acide silicique. Nous n'avons pas observé d'amélioration du pouvoir d'adsorption des lipides ni de meilleur écoulement des solvants sur la colonne par ce procédé.

Les phospholipides sont versés sur la colonne en solution chloroformique et élués par divers mélanges solvants successifs de chloroforme et de méthanol où la proportion de méthanol est progressivement augmentée.

Au cours de ce fractionnement 95 % du phosphore sont retrouvés à la sortie de la colonne.

Nous avons utilisé à la suite de POLONOVSKI la séquence des solvants suivants :

Chloroforme		50 ml.
Chloroforme-méthanol	(15 p.-1 p.)	100 ml.
» »	(12 p.-1 p.)	100 ml.
» »	(7 p.-1 p.)	100 ml.
» »	(4 p.-1 p.)	100 ml.
» »	(3 p.-2 p.)	150 ml.
» »	(5 p.-4 p.)	100 ml.
» »	(1 p.-1 p.)	100 ml.
Méthanol		100 ml.

2 - *Fractionnement des lipides non phosphorés.*

Les colonnes utilisées ont les mêmes dimensions que pour le fractionnement des phospholipides. L'acide silicique est aussi activé par passage 24 heures à l'étuve à 110° ; il est versé sur la colonne mélangé à du méthanol. La colonne est ensuite longuement lavée à l'éther de pétrole que nous distillons avant la chromatographie. Les lipides neutres sont versés sur la colonne en solution dans l'éther de pétrole. Ils sont alors fractionnés par les mélanges éluants suivants décrits par AYRAULT-JARRIER (11) :

Ether de pétrole à 1 % d'éther	100 ml.
Ether de pétrole à 4 % d'éther	100 ml.
Ether de pétrole à 10 % d'éther	100 ml.
Ether de pétrole à 50 % d'éther	100 ml.
Méthanol	100 ml.

Nous avons appliqué au fractionnement des lipides non phosphorés sur colonne d'acide silicique un autre système de solvants à la suite de BARRON et HANAHAN (14) qui séparent ainsi les graisses neutres de foie de bœuf et de rat.

Alors que NICOLAIDES et FOSTER (206) utilisaient pour ce fractionnement des mélanges de benzène et d'éther, BARRON et HANAHAN ont substitué au benzène l'hexane

normal qui possèderait selon eux, un pouvoir éluant plus sélectif que celui de l'éther de pétrole.

Tout récemment même, MEAD (196) et MUKHERJEE (203) ont recommandé l'utilisation du pentane.

Pour cette séparation chromatographique, le n hexane est purifié par distillation avant son utilisation.

La colonne d'acide silicique est lavée à l'éther puis au benzène et enfin à l'hexane.

Les lipides versés sur la colonne en solution dans l'hexane sont élués successivement par les mélanges suivants :

Hexane	50 ml.
Hexane à 15 % de benzène	100 ml.
Hexane à 5 % d'éther	100 ml.
Hexane à 20 % d'éther	100 ml.
Hexane à 30 % d'éther	100 ml.
Hexane à 50 % d'éther	100 ml.
Ether	100 ml.

Nous commentons par ailleurs les résultats de ces divers fractionnements que nous avons suivis par chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique.

3 - *Séparation du cholestérol et des esters.*

Nous avons effectué la séparation du cholestérol et de ses esters sur colonne d'alumine selon la technique de AGNERAY (1).

Nous utilisons une colonne de 15 cm de haut sur 0,8 cm de diamètre. L'alumine MERCK a été activée par passage à l'étuve à 100° pendant 24 heures. La colonne est lavée par le mélange chloroforme-éther de pétrole (1 partie-20 parties).

Les lipides, après pesée, sont repris par 2 ml. du mélange chloroforme-éther de pétrole (1 p.-20 p.) et versés sur la colonne.

Nous versons successivement les mélanges éluants suivants :

Chloroforme-éther de pétrole (1 p.-20 p.) — 50 ml.
Chloroforme-éther de pétrole (6 p.-54 p.) — 50 ml.
Chloroforme-acétate d'éthyle (30 p.-30 p.) — 50 ml.

Nous recueillons séparément chacune de ces trois fractions et après évaporation nous les dissolvons dans une petite quantité du mélange ayant servi à leur élution et les soumettons à la chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique dans le solvant heptane-heptanone (96 p.-6 p.).

4 - Distribution à contre-courant

Dans ce chapitre nous décrirons l'étude réalisée sur les lipides de l'hématie après distribution par contre-courant dans un appareil de CRAIG (50-51-52-53), modifié par DOUSTE-BLAZY (67).

La distribution à contre-courant décrite par CRAIG (50-51-52) est basée sur un principe voisin de la chromatographie de partage. Elle a été appliquée au fractionnement des protéines (107-108-109) ; plus récemment elle a été étendue à l'isolement et à la purification de certains antibiotiques (135).

Elle a été introduite depuis peu de temps dans l'étude analytique de mélanges de lipides. Elle a permis d'isoler et d'étudier des lipides qui jouent un rôle dans divers processus biochimiques tels que la coagulation (93), l'hémagglutination (44), l'hémolyse (157-277).

L'une des premières études des lipides par distribution à contre-courant a été réalisée par AHRENS (2) qui isolait à partir d'extraits lipidiques de plasma, grâce à 200 transferts dans un couple de solvants contenant de l'heptane et du nitroéthane, trois groupes de constituants : des esters de cholestérol et des glycérides, du cholestérol libre et des phospholipides.

DOUSTE-BLAZY, POLONOVSKI et VALDIGUIÉ (70) ont isolé par contre-courant à partir des lipides de sérum humain six fractions phospholipidiques différenciées par leurs solubilités et la nature de leurs constituants. Ces auteurs ont mis en évidence :

— des céphalines (3 à 6 % des phospholipides totaux) contenant à la fois de la sérine et de l'éthanolamine,

— des constituants choliniques contenant des acides aminés et des peptides,
— une fraction hémolytique, hydrosoluble, pauvre en acides gras estérifiés, renfermant près de 20 % du phosphore total,
— une fraction plus soluble dans l'éther de pétrole et contenant 6 % de phospholipides.

La distribution à contre-courant a été utilisée par Craig (15), pour séparer des mélanges d'acides gras. Elle a permis le fractionnement de lipides cérébraux par Cole, Ruthven et Lathe (47) et de phospholipides végétaux par Mac Guire et Scholfield (171-257). Les fractions peuvent être analysées par voie chimique (209) ou bien on associe distribution à contre-courant et chromatographie sur papier.

Nous-mêmes avons basé notre étude sur des dosages chimiques mais la chromatographie sur papier nous a toujours servi à contrôler l'état des lipides dans chacune de nos fractions.

Peut-être la distribution à contre-courant ne présente-t-elle pas les caractères de finesse de méthodes plus modernes de fractionnement, telles que la chromatographie d'adsorption sur acide silicique ou la chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique. Elle nous est cependant apparue de sensibilité supérieure à la technique de chromatographie sur papier à contre-courant.

I. - TECHNIQUE.

a) Appareillage.

Lovern (167) appliquant la distribution à contre-courant à l'étude des lipides de divers poissons utilisait une série d'ampoules à décantation mais ce système, en plus des difficultés de manipulation qu'il présente, donnait lieu à des retards de transferts et à des pertes de solvants en cours d'opération.

C'est pourquoi nous avons préféré utiliser des tubes de Craig (52) fixés sur un axe horizontal. Le modèle qui nous a servi est celui schématisé ci-dessous :

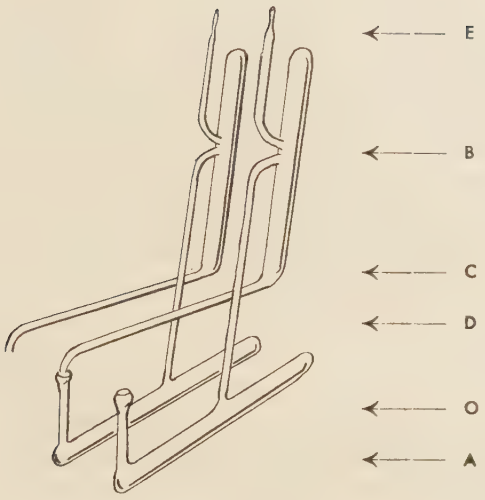

Figure 23

Disposition des tubes de CRAIG
pour le fractionnement par distribution à contre-courant

Il est formé d'un tube inférieur A, « enceinte d'équilibration » où les phases de solvants sont introduites par l'orifice O. Un tube supérieur B, où la phase légère sera décantée en passant par C pour s'écouler dans le tube homologue suivant par D. Pour éviter le reflux des solvants en cours de manipulation le système comprend une prise d'air E.

A l'endroit où chaque tube est rattaché au suivant nous avons adapté des petits embouts de polyéthylène qui, tout en n'étant pas au contact des solvants, empêchent cependant un peu leur évaporation.

Le dernier tube de la série est terminé par un fin capillaire, également dans le but de réduire au maximum l'évaporation des solvants.

Nous avons ainsi juxtaposé 20 tubes fixés sur un axe horizontal métallique autour duquel ils sont mobiles ; l'opérateur commande lui-même la rotation de l'ensemble.

Des critiques ont été formulées à l'encontre de ce dispositif par LOVERN (167) en particulier, qui prétend qu'il se produit au cours des transferts des modifications

dans la composition des solvants et que des émulsions sont susceptibles de se produire et de venir modifier la répartition des substances dissoutes. La deuxième objection n'entre pas en jeu avec le système de solvants que nous proposons car en n'agitant pas trop violemment nous n'avons jamais observé d'émulsion dans nos conditions opératoires. Après le nombre d'agitations nécessaires, un repos de quelques secondes suffit pour avoir une séparation parfaite des deux phases.

D'autre part pour éviter des variations de volume des deux phases en cours d'opération, nous laissons toujours les solvants en contact 24 h. Au cours de la saturation une partie de la phase légère passe dans la phase lourde de sorte que la phase polaire est après 24 h. plus importante que la phase éthérée.

Nous achevons la saturation préalable des deux phases par un certain nombre de transferts effectués « à blanc ». Nous réalisons ainsi 50 transferts des phases légères sur les phases lourdes et les phases légères recueillies à l'extrémité et rassemblées nous servent ensuite pour le fractionnement proprement dit.

L'opération « à blanc » et le fractionnement proprement dit sont réalisés à la même température dans une salle climatisée à 20-22° où la saturation de l'atmosphère en vapeur d'eau est également contrôlée.

Par ces quelques précautions, nous pensons réduire au maximum les risques de modification de volume des deux phases au cours du fractionnement. Malgré ces soins il n'est pas exclu qu'il ne se produise de légères modifications dans la composition des phases surtout dans l'emploi de solvants très volatils, mais, le fractionnement des phospholipides s'effectuant essentiellement au sein des phases lourdes, nous ne pensons pas que celles-ci subissent de grandes modifications.

Nous réalisons 50 transferts de phases légères sur 20 phases lourdes.

L'étude des conditions générales du fractionnement a été décrite en détail par Craig. Douste-Blazy (67) a montré l'amélioration du fractionnement des substances lipidiques en augmentant le nombre des phases lourdes et en augmentant le nombre des transferts.

Ainsi 20 tubes et 50 transferts donnent de meilleurs résultats que 20 tubes et 20 transferts seulement.

Douste-Blazy a montré que l'on n'obtient pas un meilleur rendement en dépassant 50 transferts car les phénomènes d'évaporation en fonction du temps perturbent alors trop la répartition des lipides.

Le couple de solvants choisi est le même que celui que nous utilisons pour la chromatographie sur papier à contre-courant.

b) Transferts.

On place dans le premier tube de l'appareil une quantité déterminée de l'extrait lipidique total à fractionner, dissoute par petites portions dans 5 ml de phase lourde. Les 19 autres tubes sont garnis à la pipette avec 5 ml de phase lourde. On verse alors dans le premier tube 5 ml de phase légère (tous les tubes sont calibrés de façon à faire un volume total de 10 ml).

Les deux phases (lourde et légère) sont agitées ensemble par 20 retournements successifs en inclinant les tubes de 90°, par rotation sur l'axe mobile. Après le nombre indiqué de retournements et après un repos de 30", nécessaire à la parfaite séparation des deux phases la phase légère du premier tube est transférée dans le second, en même temps que 5 nouveaux ml. de phase légère sont versés dans le premier. On opère ainsi 50 transferts suivant le même processus et en alimentant chaque fois le premier tube avec 5 ml. de phase légère fraîche. Au bout de 20 passages sur les phases lourdes la première phase légère est collectée à l'extrémité de l'appareil; elle constitue donc le tube n° 21. Les suivantes sont récoltées dans l'ordre jusqu'à la fraction 50.

Donc en fin d'opération le tube initial aura reçu 50 fois 5 ml. de phase légère. Les 30 premières phases légères sont recueillies séparément, après chaque agitation, à l'orifice du dernier tube de l'axe les 20 dernières sont récoltées en même temps que les phases acétiques, l'opération terminée, après avoir détaché les tubes de leur support.

Phases légères (numérotées de 1 à 50) et phases lourdes (de 1 à 20) sont ensuite évaporées séparément dans les tubes où elles ont été recueillies dans un dessicateur à vide, les secondes en présence d'anhydride phosphorique et chaux sodée pour favoriser l'absorption de l'acide acétique.

Les résidus de chaque tube peuvent alors être pesés, puis redissous dans une faible quantité, soit de phase lourde, soit de phase légère, pour être soumis à l'analyse chimique et à l'analyse chromatographique.

Les résidus lipidiques de chaque fraction sont repris par quelques ml de la phase correspondante. Nous prélevons des parties aliquotes de celles-ci pour l'estimation du phosphore, des esters d'acide gras et du cholestérol total.

Les bases azotées (choline essentiellement), les acides aminés et les acétalphosphatides sont appréciés par des réactions colorées correspondantes sur papier.

Nous décrivons par ailleurs les techniques que nous avons utilisées pour ces diverses estimations. Pour compléter ces résultats et dans un but de contrôle nous avons effectué, sur chacune des phases du fractionnement de Craig, la chromatographie sur papier à contre-courant, selon notre technique. Pour cela une partie de chaque résidu est évaporée à sec, reprise pour le dépôt sur le papier par le mélange alcool isoamylique-benzène (1 vol.-1 vol.) qui en s'évaporant rapidement, favorise un dépôt régulier des lipides sur le papier.

5 - L'électrophorèse sur papier

L'électrophorèse sur papier des stromas de globules rouges obtenus après hémolyse par la saponine à 1 g par litre dans l'eau a été réalisée dans un appareil de type Elphor en tampon véronal acide-véronal sodique de pH = 8,6 et de force ionique 0,1.

Nous utilisons le papier Schleicher et Schüll 2043 A de préférence aux papiers Arches.

La migration dure 16 heures sous un potentiel de 1,7 volts par cm.

Les bandes de papier sont séchées à la température ambiante, fixées quelques minutes à l'étuve à 100° puis colorées.

Pour révéler les protéines nous avons choisi la coloration à l'amidoschwartz ; les lipoprotéines sont colorées par la technique au Noir Soudan que nous avons détaillée par ailleurs.

6 - Spectographie infra-rouge

Peu d'auteurs l'ont appliquée à l'analyse des lipides globulaires.

D'application nouvelle, elle a étendu son champ d'action au domaine des lipides. On a pu étudier les spectres d'acides gras saturés ou insaturés, des glycérides sous la forme de mono, di ou triesters.

Les phospholipides ont été plus particulièrement analysés par cette méthode. Marinetti et Stotz (191) ont décrit les spectres de sphingolipides, Baer (12) ceux des céphalines, Uzmann (275) ceux de cérébrosides.

Le spectre des lécithines a donné lieu à de nombreux travaux. Nous rappellerons les résultats de Hanahan et Jayko (104) et de Valdiguié, Mathis, Henry et Douste-Blazy (279) sur le spectre comparé des ovolécithines et sérolécithines fractionnées par distribution à contre-courant.

Appliquée à l'étude analytique des lipides, la spectrographie infra-rouge est à coup sûr d'un grand intérêt dans la mesure ou les individualités étudiées ont été préalablement bien isolées et purifiées.

Elle doit donc constituer une méthode d'étude complémentaire des autres méthodes physiques et des méthodes chimiques.

B - Méthodes chimiques

L'analyse des phospholipides est surtout effectuée par le dosage du phosphore et des esters d'acides gras ; les individualités phospholipidiques sont estimées par le dosage des bases correspondantes, essentiellement de la choline. Les lipides non phosphorés sont analysés par le dosage du cholestérol et des acides gras libres.

Nous avons également déterminé l'indice d'iode pour apprécier la quantité d'acides gras insaturés présents.

Nous décrivons succintement les techniques de ces divers dosages.

1) Dosage du phosphore

Nous l'avons effectué après minéralisation, sur l'extrait total ou sur les phospholipides isolés. De préférence à la minéralisation perchlorique, préconisée par KING (138), par SPERRY (262), par ZILVERSMIT (304-305), nous avons préféré utiliser la minéralisation par l'acide sulfurique et l'eau oxygénée à 110 vol., selon DELSAL (39), FISKE et SUBRAROW (82), ALLEN (3), suivie de coloration par le molybdate et de réduction du complexe par le sulfite de sodium et l'hydroquinone selon BRIGGS (34).

Le dosage du phosphore suffit pour apprécier le taux des phosphatides. De nombreux auteurs, dont SCHMIDT (255), SCHMIDT, BENOTTI et TANHAUSER (256) conseillent de multiplier le taux de phosphore par 25 pour obtenir le taux de phospholipides.

2) Dosage des esters d'acides gras

Il s'effectue selon la méthode de BAUER (16) basée sur la combinaison du réactif au perchlorure de fer de HILL (113) avec les acides hydroxamiques. Cette réaction donne une coloration violette qui est appréciée au photomètre.

Nous avons utilisé une modification de cette technique décrite par JARRIER et POLONOVSKI (127).

Le résidu lipidique sec est repris par 0,3 ml. de solution alcoolique à 2,5 % de chlorhydrate d'hydroxylamine et 0,3 ml de soude alcoolique à 2,5 %. Après 1 heure de contact à la température du laboratoire, on ajoute 10 ml de solution alcoolique à 5 % de perchlorure de fer.

Après 30 min. à l'obscurité la coloration est lue à l'électrophotomètre.

3) Dosage du cholestérol

Le cholestérol total est dosé sur l'extrait chloroformique des lipides totaux ou des lipides non phosphorés par l'apprécation de la coloration de Lieberman-Burchard.

4) Détermination de l'indice d'iode

La quantité d'acides gras insaturés est évaluée selon la méthode de Rosenmund modifiée par Yasuda (302). Le réactif halogénant employé est une solution dans l'acide acétique de dibromopyridine.

5) Dosage des acétalphosphatides

Nous avons effectué leur dosage par la technique de Hack (100) et de Rapport et Alonzo (241), utilisée par Marinetti (186).

6) Dosage des bases azotées

Ces divers dosages ont été complétés par l'appréciation de la coloration sur papier des bases azotées, essentiellement de la choline, par l'acide phosphomolybdique et le chlorure stanneux.

On a pu apprécier les diverses individualités phospholipidiques soit par séparation grâce à leurs différences de solubilité, soit par le dosage de leurs constituants azotés après hydrolyse.

A cet effet Kirk (141) précipite les phosphatides par l'acétone et le chlorure de magnésium et extrait les glycérophosphatides par l'éther de pétrole, ce solvant insolubilisant les sphingomyélines.

De sévères critiques à ce procédé ont été formulées par SINCLAIR et THANHAUSER (267) et il ne semble pas que l'on puisse accorder un large crédit à ce mode de dosage individuel.

Plus exacte est la détermination des phosphatides par l'étude de leurs produits d'hydrolyse, ces derniers se différenciant par la nature de leur alcool et de leurs constituants azotés.

De nombreux auteurs dosent ainsi après hydrolyse : le glycérol, les acides gras, la choline, l'éthanolamine et la sérine.

Diverses conditions d'hydrolyse ont été envisagées. ARTOM (8) recommande l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6 N pendant 3 heures à ébullition au réfrigérant à reflux.

THANHAUSER et BONCODDO (268), HACK (99) préfèrent réaliser une hydrolyse alcaline par la potasse 3N à 37° pendant 24 heures.

Les divers phosphatides ne sont pas hydrolysés avec les mêmes vitesses. Dans certaines conditions, lécithines et sphingomyélines qui renferment toutes deux de la choline ne sont pas également hydrolysées : l'hydrolyse alcaline 16 heures à 37° ne touche pas les lécithines. Ce moyen de doser séparément les deux phosphatides choliniques a été mentionné par DAWSON (58).

Le dosage de la choline qui correspond aux lécithines et sphingomyélines (95 % de la choline totale) est réalisé soit sur un hydrolysat de phosphatides débarrassé des acides gras, soit sur l'extrait lipidique total.

Il existe diverses méthodes de dosage de la choline :

— des méthodes pondérales,
— des méthodes volumétriques par iodométrie,
— des méthodes utilisant le sel de Reinecke.

Cette dernière, qui semble la meilleure, consiste à ajouter à l'hydrolysat de phospholipides, une solution fraîchement préparée de reineckate d'ammonium à 2 % dans Hcl 1,2 N. Après filtration et lavage, le précipité de reineckate de choline est dissous dans l'acétone qui se colore en rouge. L'intensité de la coloration est appréciée à l'électrophotomètre.

La valeur trouvée pour la choline multipliée par 5,56 donne la valeur des phosphatides à choline.

Signalons que le taux de chaque phospholipide peut-être connu en établissant la valeur du rapport choline/phosphore ; la proportion d'une molécule de choline pour un atome de phosphore par exemple est en faveur des lécithines.

Nous disposons donc pour notre étude des lipides de méthodes chimiques et physiques. Chacune étant en elle-même partiellement critiquable, nous nous sommes efforcés de les associer pour une étude plus complète et plus valable.

LES RÉSULTATS

A. - Hématies normales

I - Chromatographie sur papier à contre-courant

Pour l'étude du fractionnement des lipides globulaires nous nous sommes appuyés sur les travaux antérieurs effectués par Douste-Blazy, Polonovski et Valdiguié (66, 67, 68, 70, 220), dans des conditions identiques, d'une part, sur des phospholipides témoins, d'autre part, sur les lipides plasmatiques.

Comme ces auteurs, nous avons utilisé le couple de solvants décrit ci-dessus ; il nous a donné d'excellents résultats.

Dans ces conditions nous avons retrouvé les Rf déjà signalés pour des ovolécithines purifiées, entraînées par le solvant hydrophile.

Selon que la proportion d'eau du couple est de 10 % ou 3 % le Rf des lécithines varie de 0,60 à 0,80.

Des préparations de céphalines purifiées ont montré que ces substances insolubles dans l'acide acétique et peu solubles dans le méthanol aqueux sont uniquement entraînées par les solvants hydrophobes ; elles restent donc au niveau de rencontre des deux phases ; leur Rf est égal à 0.

Des sphingomyélines de cerveau de bœuf purifiées ont été chromatographiées et, étant donné leurs caractères de solubilité voisins des lécithines, ces substances, entraînées par la phase lourde, montrent par coloration au Noir Soudan et à l'acide phosphomolybdique un spot au même niveau que les lécithines.

La chromatographie de ces lipides témoins nous a permis de tirer des conclusions du fractionnement des lipides obtenus à partir des hématies humaines.

1. - *Préparation de l'extrait.*

Les échantillons de sang (*) sont traités le plus rapidement possible après le prélèvement ; ils sont toujours de groupe 0. Le sang est recueilli sur une solution citratée (à raison de 6 ml. de solution pour 35 ml. de sang) la solution anticoagulante a la composition suivante :

Acide citrique	1,60 g
Soude en pastilles	0,60 g
Glucose	1,60 g
Eau . . . . . q.s.p.	60 ml

La dilution obtenue ne perturbe pas nos résultats puisque après centrifugation 10 min. à 2 500 tours/min. le plasma est rejeté. Le culot globulaire de centrifugation est lavé trois fois avec une solution isotonique de chlorure de sodium ; chaque fois le surnageant est rejeté (ceci dans le but d'éliminer les dernières traces de plasma).

Nous faisons alors l'extraction des lipides selon la technique de Hewitt (112), décrite dans un chapitre antérieur.

Le résidu d'évaporation des solvants est repris par du méthanol, car nous avons remarqué que le chloroforme seul n'entraîne pas la totalité des lipides ; en effet lorsque le résidu lipidique est repris par le chloroforme, il laisse une petite fraction insoluble qui éluée par le méthanol s'est révélée contenir une quantité appréciable de phospholipides.

Après purification par dialyse, l'extrait, une nouvelle fois évaporé à sec, est repris par une quantité convenable de chloroforme-méthanol (1-1) pour être réparti en fractions aliquotes sur les chromatogrammes (à raison en général de 200 à 500 µg de lipides ou de 5 à 10 µg de phosphore par tache).

Nous avons donc soumis à la chromatographie l'extrait des lipides totaux, préparé et purifié comme nous

(*) Nous tenons à exprimer ici notre gratitude au Professeur J. Ruffié qui nous a fourni la plupart des échantillons sanguins.

venons de l'indiquer, et les fractions lipidiques obtenues par l'acétone ou par chromatographie sur colonne d'acide silicique.

2. *Chromatographie de l'extrait lipidique total*

Des chromatogrammes de lipides totaux nous ont montré, dans les conditions que nous avons décrites, deux taches, toutes deux colorables par le Noir Soudan mais d'intensités très différentes :

— l'une, de Rf = 0, intense, révélée seulement par le Noir Soudan,

— l'autre, de Rf = 0,70, révélée aussi bien par le Noir Soudan que par l'acide phosphomolybdique (par la coloration au Noir Soudan cette tache est plus importante que la précédente).

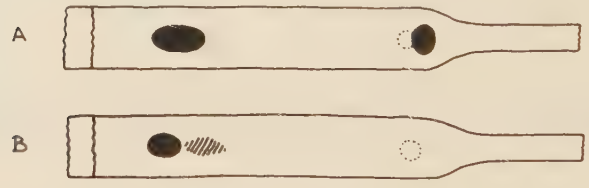

Figure 22

Chromatogrammes des lipides totaux d'hématies
A. - Coloration au Noir Soudan.
B. - Coloration à l'acide phosphomolybdique.

Seule de ces deux taches celle de Rf = 0 se colore intensément par la ninhydrine et l'acide silicotungstique (cholestérol). Les deux taches donnent la coloration des acétalphosphatides à la 2-4 dinitrophénylhydrazine.

3. *Chromatographie de l'extrait acétonique*

Des chromatogrammes des seuls lipides solubles dans l'acétone nous ont donné les résultats suivants : le Noir Soudan colore intensément comme pour les lipides totaux la tache éthérochloroformique.

Cette tache donne une très faible réaction positive par pulvérisation de ninhydrine et une coloration intense soit après pulvérisation d'acide silicotungstique, soit par la coloration de LIEBERMANN-BURCHARD.

Il semble donc bien s'agir ici de la présence de glycérides et de cholestérol libre.

La coloration par l'acide phosphomolybdique et par le réactif de HANES et ISHERWOOD sont négatives. Il n'y a pas de phospholipides.

Nous n'avons pas retrouvé dans les lipides globulaires les phospholipides acétonosolubles que DOUSTE-BLAZY (67) avait caractérisés dans l'extrait acétonique des lipides plasmatiques (l'un de Rf = 0, l'autre de Rf = 0,70).

4. *Chromatographie de l'insoluble acétonique*

Ces lipides insolubilisés par l'acétone sont redissous dans le chloroforme-méthanol (1 vol.-1 vol.).

Le Noir Soudan révèle ici deux taches d'intensités assez différentes :

— l'une, la moins intense, dans le secteur éthéro-chloroformique, de Rf = 0 ;

— l'autre, allongée, importante, dans le secteur acétique, de Rf = 0,70 à 0,80.

Ces deux taches sont phosphorées, mais l'acide phosphomolybdique ne colore que la tache acétique. Elles sont colorables par le réactif à la 2-4 dinitrophénylhydrazine. Ceci laisse à penser que céphalines et phosphatidylcholines doivent exister, en partie au moins, sous la forme d'acétals.

Par pulvérisation de ninhydrine, seule la tache de Rf = 0 est positive.

La coloration de LIEBERMANN est négative pour les deux taches.

L'ensemble de ces résultats sur l'extrait lipidique total et sur les groupes fractionnés : phospholipides et glycérides, stérides, cholestérol nous montre donc :

1° Lipides totaux :

Une séparation entre d'une part : glycérides ,stérides et cholestérol libre, de Rf = 0 et d'autre part des phospholipides (lécithines, lysocithines, sphingomyélines), de Rf voisin de 0,70.

2° Phospholipides :

Une séparation au sein de ce groupe en :

a) lécithines, lysocithines, sphingomyélines entraînées par la phase acétique et révélées à la fois par le Noir Soudan et l'acide phosphomolybdique ;

b) Céphalines entraînées par la phase éthérochloroformique révélées par le Noir Soudan, le réactif de HANES et ISHERWOOD et la dinitrophénylhydrazine.

En conclusion l'emploi de cette technique de chromatographie à contre-courant sur papier nous a permis de mettre en évidence et d'isoler parmi les lipides d'hématies humaines normales :

— une fraction entraînée par la phase éthérochloroformique constituée de deux groupes de lipides, l'un soluble dans l'acétone comprenant les glycérides, les acides gras libres et le cholestérol libre ; l'autre, insoluble dans l'acétone, représentant les phosphatidyléthanolamines et phosphatidylsérines,

— une fraction entraînée par la phase acétique, entièrement insoluble dans l'acétone, qui correspond aux lécithines et probablement aussi aux sphingomyélines et aux lysolipides que nous ne sommes cependant pas arrivés par notre méthode de chromatographie à séparer parfaitement entre eux.

2 - Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique

Nous avons soumis à ce système de chromatographie l'extrait lipidique total des hématies et certaines fractions de cet extrait : phospholipides et lipides non phosphorés. Les premiers ont été isolés, de préférence à la précipitation par l'acétone, longue et imprécise, par chromatographie sur colonne d'acide silicique qui permet une meilleure séparation et est de réalisation plus facile.

A la suite de MARINETTI et STOTZ (191) qui réalisent la chromatographie directe des lipides du sérum, sans extraction préalable par des solvants organiques, nous

avons chromatographié directement les stromas eux-mêmes des globules rouges, obtenus par les procédés que nous utilisons pour réaliser l'électrophorèse des lipoprotéines globulaires.

Nous déposons sur le papier les stromas en suspension dans du sérum physiologique.

Ce système permet de bonnes séparations des lipides et nous avons retrouvé les mêmes taches que dans l'extrait lipidique total.

Cette méthode présente un certain nombre d'avantages et d'inconvénients ; elle est avantageuse car elle permet une bonne séparation des diverses fractions lipidiques et permet d'éviter l'extraction par des solvants organiques qui est longue et peut entraîner des pertes de lipides.

Elle a par contre un inconvénient : la présence d'hémoglobine résiduelle dans les stromas forme sur les chromatogrammes des trainées brunâtres et ralentit la progression des lipides sur le papier, de sorte que leurs Rf sont assez nettement abaissés.

Lorsque les chromatogrammes sont colorés à la Rhodamine ces taches prennent un aspect bleu-violacé lorsqu'on les observe en lumière ultra-violette.

Cette méthode, malgré quelques imperfections nous paraît cependant convenable.

1 - *Lipides totaux.*

Les diverses techniques de coloration utilisées nous ont permis d'identifier sur les chromatogrammes de lipides totaux, réalisés dans le solvant diisobutylcétone-acide acétique-eau (40-25-5), plusieurs taches lipidiques que nous allons envisager séparément. (figure 25).

Nous avons toujours en front de nos chromatogrammes une large bande fluorescente, due à l'entraînement des lipides du papier ou des hydrocarbures ; elle ne disparaît qu'incomplètement par des lavages préalables avec du chroroforme et du méthanol.

— La tache VII, près du front du solvant, de Rf 0,90-0,95, révélée par la Rhodamine 6G, donne un spot intense par la réaction de LIEBERMANN.

Elle n'est pas phosphorée et ne contient pas de bases azotées. Cette fraction représente les glycérides, le cholestérol et les acides gras.

— Les taches VI et V, très voisines, de Rf = 0,55 et 0,50 (souvent réunies en une seule tache) sont révélées à la fois par la Rhodamine 6G, la ninhydrine et la réactif à la 2-4 dinitrophénylhydrazine. Elles représentent respectivement les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylsérines. Ces deux phosphatides existent probablement à la fois sous la forme d'esters et d'acétals.

— La tache IV, de Rf = 0,45, révélée par la Rhodamine 6G, par l'acide phosphomolybdique et le le chlorure stanneux, par le réactif de HANES et ISHERWOOD, représente les phosphatidylcholines.

Comme les céphalines, les lécithines existent en partie au moins sous la forme d'acétals comme en témoigne le test à la 2-4 dinitrophénylhydrazine.

— La tache III de Rf = 0,38-0,40, bien différenciée de la précédente, révélée par la Rhodamine 6G est, elle aussi, phosphorée.

Elle correspond aux sphingomyélines. Cette tache donne une coloration par la ninhydrine qui semble indiquer la présence à côté des sphingomyélines de lysophosphatidyléthanolamines. La superposition de ces deux phosphatides à ce même Rf a déja été signalée dans les hématies par POLONOVSKI (213), par KATES, ALLISON et JAMES (133) et récemment par DE GIER et VAN DEENEN (91).

— La tache II, de Rf = 0,32 à 0,34, révélée par la Rhodamine 6G et par le phosphomolybdate, représente les lysocithines que nous avions mises en évidence après distribution à contre-courant.

KATES, ALLISON et JAMES (133) ont montré que dans ce système de chromatographie les inositolphosphatides et les lysocithines ont le même Rf.

Nous ne sommes pas en mesure d'affirmer la présence certaine d'inositolphosphatides parmi les lipides des hématies.

— Nous rencontrons toujours dans les extraits lipidiques globulaires une tache relativement importante de Rf faible 0,18 à 0,20) révélée seulement par la Rhodamine 6G. Elle n'est ni phosphorée ni cholinique. Peut être sommes-nous en présence d'un lipide encore lié à sa copule azotée, cette dernière ne lui permettant pas un mouvement plus important dans ce système solvant.

Le test à la ninhydrine est négatif. Nous ignorons la nature de ce lipide.

— Enfin la tache I n'est pas entraînée par ce solvant. Selon MARINETTI (184) elle représente en

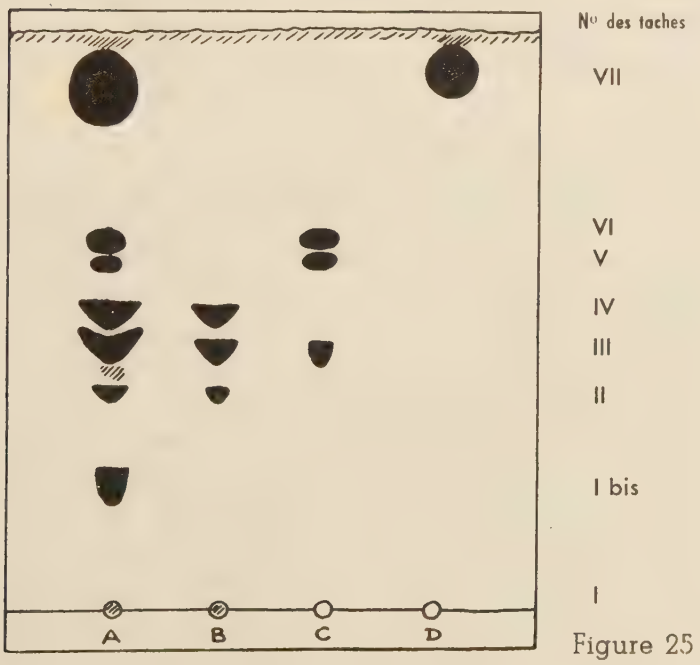

Figure 25

Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique des lipides totaux de globules rouges

A — Coloration à la rhodamine 6G —
B — Coloration à l'acide phosphomolybdique
C — Coloration à la ninhydrine
D — Coloration par la réaction de LIEBERMANN

partie au moins des traces des divers phosphatides, modifiés sans doute au cours de la chromatographie, dans leur structure chimique.

Son importance nous a fait penser qu'il s'agissait peut être de glucolipides. Divers auteurs dont KLENK et LAUENSTEIN (145), REED et MARINETTI (243), YAMAKAWA et SUZUKI (292), YAMAKAWA, IRIE et IWANAGA (290) évaluent en effet à 10 % des lipides totaux de l'hématie ces lipides unis à des radicaux glucidiques.

Nous avons vu que ce sont ces lipopolysaccharides, selon RADIN (240), KLENK et LAUENSTEIN (14-145), YAMAKAWA (296-293-291) et l'école Japonaise, qui sont responsables des propriétés immunochimiques de l'hématie.

Après hydrolyse chlorhydrique cette tache nous a permis d'obtenir un test positif par la réaction à l'anthrone. Nous ne nous sommes pas attachés à l'étude du radical glucidique de cette fraction.

2 - *Lipides non phosphorés.*

La chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique dans le solvant heptane-diisobutylcétone (96 vol.-6 vol.) nous a permis de séparer parmi les lipides non phosphorés plusieurs individualités que nous avons identifiées par les colorations habituelles. (Figure 26).

— La tache V en front de solvant, de Rf = 0,90 n'est révélée que par la Rhodamine 6G. Elle devrait renfermer des stérides mais la réaction de LIEBERMANN étant négative, l'hypothèse de la présence de stérides ne peut être retenue. Peut être renferme-t-elle des hydrocarbures ?

— La tache IV de Rf = 0,75, colorée seulement par la Rhodamine 6G représente les triglycérides.

— La tache III de Rf = 0,35 révélée par la Rhodamine et donnant une intense réaction de LIEBERMANN, représente le cholestérol libre.

Au-dessus de cette tache III on observe une trainée mal différenciée, parfois légèrement bleu-

tée en fluorescence, que AYRAULT-JARRIER (11) attribue à des acides gras libres.

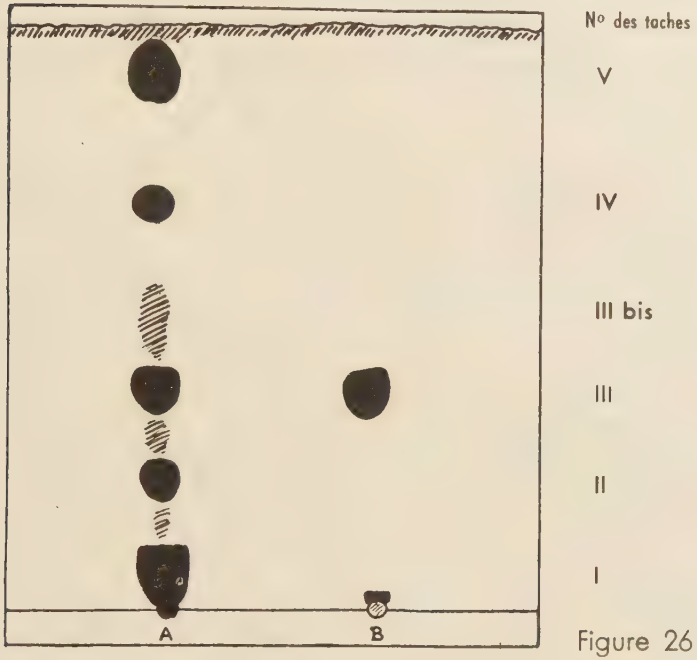

Figure 26

Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique des lipides non phosphorés de globules rouges

A — Coloration par la rhodamine 6G
B — Coloration par la réaction de LIEBERMANN

— Les taches II et I, colorables seulement par la Rhodamine, parfois assez mal différenciées entre elles, représentent respectivement les diglycérides et les monoglycérides.

En conclusion, ce système de séparation des lipides, de sensibilité plus grande que la chromatographie sur papier à contre-courant, nous a permis de mettre en évidence :

1. Parmi les phosphatides :
   — des céphalines,
   — des lécithines,
   — des sphingomyélines et des lysocéphalines,
   — des lysocithines.

2. Parmi les lipides non phosphorés :
   — des triglycérides,
   — des acides gras libres,
   — du cholestérol libre,
   — des diglycérides et des monoglycérides.

3 - Chromatographie sur colonne d'acide silicique

Préconisées par Fillerup et Mead (81), par Marinetti et Stotz (189), les méthodes chromatographiques sur acide silicique ont pris depuis quelques années un essor considérable.

Appliquées au fractionnement des lipides globulaires, elles ont permis une plus grande connaissance de la nature de ces molécules et de leurs valeurs respectives.

De nombreux travaux ont eu pour objet l'étude des lipides de l'hématie après chromatographie sur acide silicique.

Nous envisagerons succinctement la genèse de ces travaux.

Turner (274), séparant les phospholipides de globules rouges de diverses espèces animales sur colonne d'acide silicique, en éluant avec des mélanges de chloroforme et de méthanol, isolait des céphalines, des lécithines et des sphingomyélines. Les lipides de diverses espèces animales diffèrent surtout, selon Turner, par leurs acides gras.

Il montrait, en outre, que les globules rouges de ruminants, pauvres en lécithines, n'étaient pas sensibles aux hémolysines des venins de cobra, qui sont des lécithinases.

La chromatographie sur acide silicique a permis également à Phillips et Roome (217) d'isoler parmi les lipides globulaires, en utilisant le chloroforme enrichi progressivement en méthanol, puis le méthanol contenant un peu d'eau, des céphalines, des lécithines, des sphingomyélines et des lysocithines.

Ces lysocithines, formant 2 % des phospholipides totaux, présentent une action hémolytique vis-à-vis

des globules rouges de mouton. Il ne peut s'agir de lysocithines du sérum, les globules rouges ayant été lavés à trois reprises au sérum physiologique avant l'extraction.

D'autre part, PHILLIPS (216) affirme qu'il ne peut s'agir d'artéfacts produits au cours de l'extraction.

HANAHAN (105) de son côté, après chromatographie sur acide silicique des lipides globulaires humains et bovins, étudie les phosphatides et les lipides non phosphorés.

Contrairement à JAMES (126), après élution des lipides neutres de la colonne d'acide silicique par des mélanges d'hexane, de benzène et d'éther, il conclut que, dans cette classe de lipides, le cholestérol libre est le constituant essentiel.

Parmi les phospholipides, fractionnés grâce à des mélanges de chloroforme et de méthanol, les phosphatidyléthanolamines, qui renferment une forte proportion d'acides gras insaturés, représentent 30 % des phospholipides totaux.

POLONOVSKI (213), dans une étude de l'incorporation du ^{32}P dans les phosphatides globulaires, a pu ensuite les fractionner grâce à l'emploi d'une séquence de solvants où le gradient du méthanol est progressivement augmenté dans le chloroforme. Nous avons nous-même utilisé cette même séquence de solvants pour effectuer notre fractionnement.

Tout récemment, MATSUMOTO (195), dans une étude comparative des phospholipides des stromas de globules rouges et de rate de mammifères, a pu réaliser une séparation sur colonne d'acide silicique et d'hyflo-super-cel (2 p. — 1 p.) de ces lipides phosphorés, en augmentant progressivement dans le chloroforme la proportion du méthanol.

Après insolubilisation dans l'éther des sphingomyélines et des glucolipides, il isole parmi les phosphatides éthéro-solubles de globules rouges des phosphatidyléthanolamines et des phosphatidylsérines, des lysophosphatidyléthanolamines, des lécithines et des lysocithines.

Nous avons déjà mentionné que les quantités de lysophosphatides trouvées par MATSUMOTO dans les stromas de globules rouges humains nous paraissaient élevées.

Elles représenteraient, pour les lysocéphalines et les lysocithines, 17, 5 et 23 %, alors que céphalines et lécithines constitueraient 29 et 30 % de la totalité des phosphatides éthéro-solubles.

Ces valeurs ne sont pas en accord avec celles données par la plupart des auteurs.

La présence constante, dans les globules rouges de mammifères, d'un constituant mineur représentant 0,3 % des lipides insolubles dans l'acétone, qui représenterait un inositolphosphatide, confirmée par MATSUMOTO, est, elle, en accord avec la valeur attribuée par PHILLIPS (216).

Ces valeurs légèrement différentes doivent-elles être attribuées à la technique chromatographique elle-même ? Il ne le semble pas, puisque dans leur ensemble les divers résultats apportés concordent bien. Cependant quelques auteurs, dont TURNER (273) et REED (243), ont affirmé que la chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique présentait un meilleur pouvoir de séparation que la chromatographie sur colonne d'acide silicique, en particulier pour la séparation des lécithines et des sphingomyélines.

Quoi qu'il en soit, les techniques de chromatographie sur acide silicique, très largement utilisées à ce jour, ont contribué à une meilleure connaissance des valeurs respectives des divers constituants lipidiques des hématies.

Nous les avons nous-même appliquées pour cette étude analytique.

1. – FRACTIONNEMENT DES PHOSPHOLIPIDES.

Ils ont été préalablement séparés des lipides non phosphorés, soit par précipitation acétonique et dissolution du précipité dans un mélange de chloroforme et de méthanol, soit par chromatographie sur colonne d'acide silicique et élution par le chloroforme et le méthanol, puis par le méthanol seul.

Les graisses neutres ont été éluées par le chloroforme.

De très nombreuses méthodes de fractionnement des phosphatides des hématies ont été proposées. Les solvants d'élution sont presque toujours constitués de mé-

langes de chloroforme et de méthanol où le gradient du solvant polaire est progressivement augmenté.

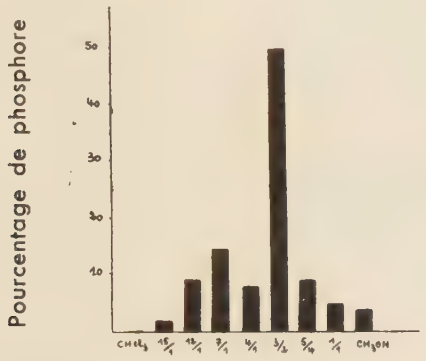

Figure 27

Fractionnement des phospholipides globulaires sur colonne d'acide silicique

Nous avons déjà décrit les mélanges solvants utilisés, ainsi que la technique que nous avons appliquée.

Le fractionnement a été suivi par :

— le dosage du phosphore sur chacune des fractions,

— la chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique dans le mélange de solvants : 2-6 diméthyl-4 heptanone, acide acétique, eau (40, 25, 5).

Les résultats du dosage du phosphore, représentés dans la figure 27 sont exprimés en pourcentage du phosphore lipidique total.

Ils nous montrent deux sommets phosphorés dans les fractions 7/1 et 3/2, ce dernier constituant à lui seul un peu plus de la moitié du phosphore total.

Les fractions phosphorées ont pu être identifiées après chromatographie sur papier imprégné par coloration à la Rhodamine 6 G.

— La fraction chloroformique ne nous montre la présence d'aucun phospholipide; elle nous permet d'éliminer les dernières traces de lipides neutres.

— La fraction 15/1, qui représente un faible pourcentage de phosphore, nous montre, en chromatographie sur papier, une tache de Rf élevé, qui pourrait correspondre aux acides phosphatidiques, décelés par Polonovski (213) dans cette fraction par autoradiographie ; il ne nous a pas été possible de déceler la présence de phosphore sur nos chromatogrammes.

— La fraction 12/1 (9 % du phosphore total), montre deux taches colorées par la ninhydrine, de Rf = 0,55 et 0,50. Elles représentent les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylsérines. Ces deux phosphatides ne sont pas toujours séparés ; ils forment souvent une seul tache sur les chromatogrammes des lipides totaux.

— La fraction 7/1 (14 % du phosphore total) comprend trois taches colorées par la ninhydrine. Deux représentent, comme dans la fraction précédente, les céphalines ; la troisième, de Rf = 0,38, est constituée par des lysocéphalines.

— La fraction 4/1 (8 % du phosphore total) ne contient pratiquement plus de céphalines. Elle est surtout constituée par des phosphatidylcholines dont le Rf, en chromatographie sur papier, est de 0,42; elle montre aussi un début de passage des sphingomyélines.

— La fraction 3/2 (52 % du phosphore total) est constituée à la fois par des lécithines et par des sphingomyélines, de Rf = 0,38. Ces deux taches sont colorées par le phosphomolybdate et le chlorure stanneux.

Dans ces deux fractions, est présent un lipide de Rf faible (0,18—0,20), coloré seulement par la Rhodamine, ne contenant ni phosphore ni choline et dont nous ignorons la nature exacte.

— La fraction 5/4 (9 % du phosphore total) est surtout représentée par des sphingomyélines. Elle contient aussi des lécithines.

— La fraction 1/1 (4 % du phosphore total) contient encore des sphingomyélines, un peu de lécithines et un lipide nouveau, de Rf = 0,32, coloré au réactif de Draggendorf. Celui-ci est une lysocithine.

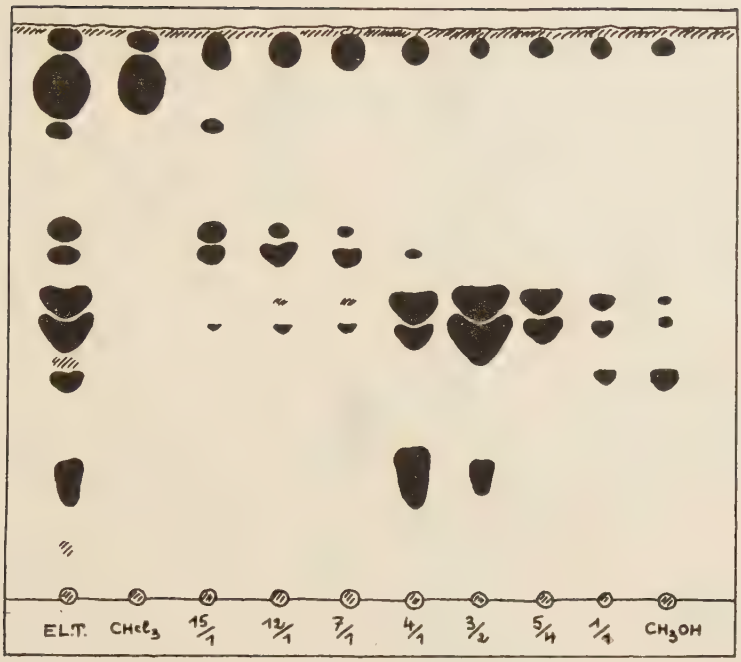

Figure 28

Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique des phospholipides des hématies normales

— La fraction méthanolique enfin (2 % du phosphore total) est surtout constituée par des lysocithines. A côté de celles-ci, une petite quantité de lécithines et de sphingomyélines est encore présente.

La chromatographie sur acide silicique, malgré quelques imperfections, a été précieuse pour la séparation des lipides globulaires; associée à la chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique, elle nous a permis d'isoler des céphalines et des lysocéphalines, des lécithines et des lysocithines, des sphingomyélines.

2. – Fractionnement des lipides non phosphorés.

Dans l'hématie, les glycérides représentent environ 3 % des lipides totaux, répartis en quantités égales de triglycérides, de diglycérides et de monoglycérides.

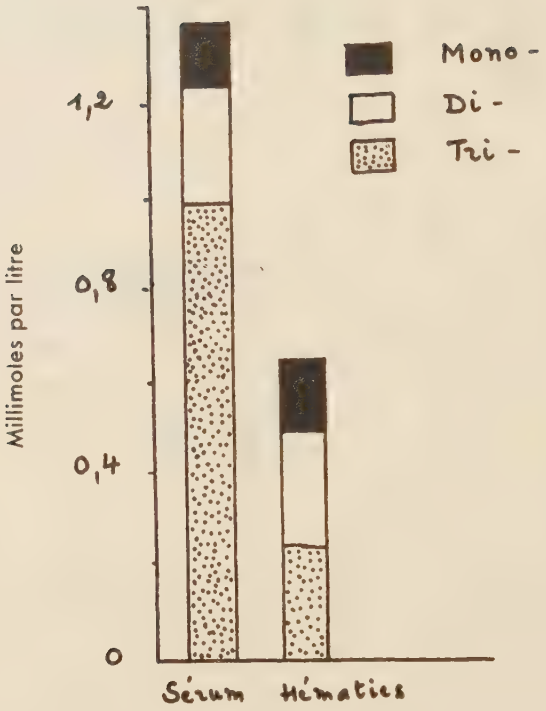

Figure 29

Répartition des glycérides de sang humain d'après VACCA (276)

VACCA (216), étudiant après chromatographie sur acide silicique, les glycérides du sérum et des hématies humains, conclut à une différence portant essentiellement sur les triglycérides, trois fois plus abondants dans le sérum que dans les globules rouges.

HIRSCH et AHRENS (115), réalisant une étude des glycérides globulaires sur colonne d'acide silicique, ont apporté des résultats comparables à ceux de VACCA.

La valeur des glycérides globulaires, remarque VACCA, n'est pas influencée par une augmentation des graisses neutres du plasma.

La chromatographie sur colonne d'acide silicique nous a permis de séparer des phospholipides globulaires les lipides neutres (glycérides, cholestérol) et les acides gras libres ; l'élution a été faite par le chloroforme selon BORGSTRÖM (29), BARRON et HANAHAN (14), et selon MARI-

NETTI (190) qui l'utilise pour purifier les phosphatides de cœur de porc.

Les lipides non phosphorés sont seuls entraînés ; nous avons vérifié dans l'éluat l'absence de phosphore.

La séparation des lipides neutres sur colonne d'acide silicique peut aussi être réalisée, selon LA ROCHE (153) et BORGSTRÖM (29), par une élution à l'éther qui entraîne ces lipides avant qu'ils ne soient adsorbés. L'éther peut donc remplacer le chloroforme.

La chromatographie sur acide silicique nous a permis de séparer ensuite ces lipides isolés en utilisant des mélanges de solvants appropriés, renfermant, comme solvant apolaire, soit de l'éther de pétrole, soit de l'hexane.

Nous avons utilisé pour cette séparation deux couples de solvants différents et nous donnons les résultats obtenus dans les deux cas. Les lipides isolés sont identifiés grâce à la chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique dans le solvant : n heptane- 2-6 diméthyl 4 heptanone (96 p. — 6 p.), décrit par MARINETTI (191).

Le fractionnement sur colonne des lipides non phosphorés, utilisant, comme mélanges éluants, de l'éther de pétrole enrichi progressivement en éther, puis du méthanol, nous a montré les résultats suivants (Figure 30) :

— La première fraction renferme essentiellement des triglycérides (tache de Rf = 0,75); une tache de Rf = 0,40, Liebermann positive, correspond à un début de passage du cholestérol libre.

Nous retrouvons en front une tache lipidique, à la place des esters de cholestérol, mais ne donnant pas la réaction de Liebermann. Nous ignorons la nature de ce lipide.

— La fraction II contient un peu de cholestérol libre et une quantité encore importante de triglycérides.

— La fraction III est essentiellement constituée par du cholestérol libre ; elle représente la quasi totalité de celui-ci.

— La fraction IV contient encore du cholestérol libre, des acides gras libres formant une traînée au-dessus du cholestérol et déjà présents dans la fraction III.

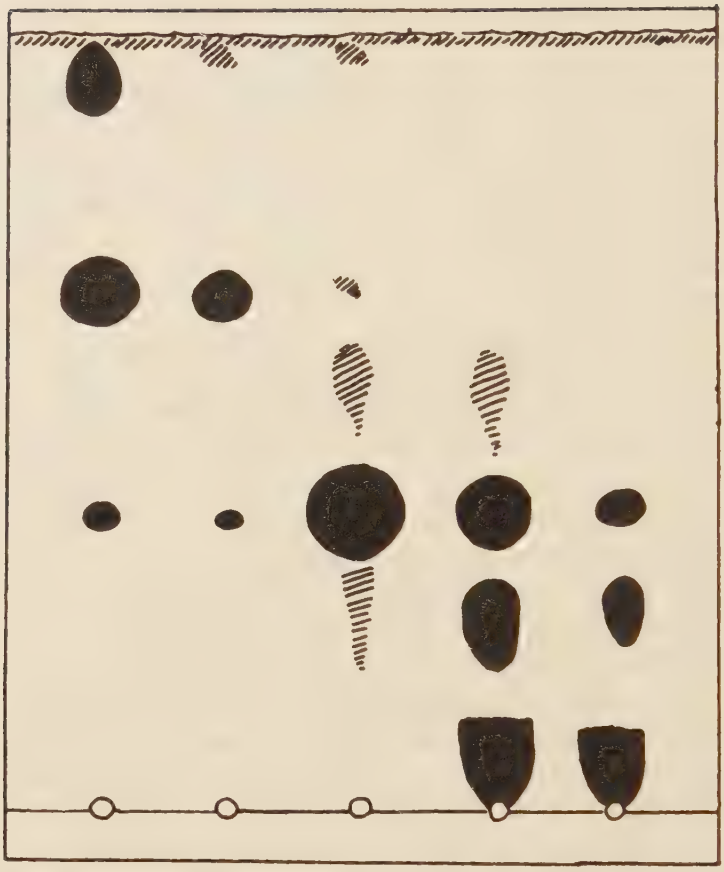

Figure 30

Chromatogramme des lipides non phosphorés de globules rouges sur papier imprégné d'acide silicique, après chromatographie sur colonne et élution par les mélanges d'éther de pétrole et d'éther puis de méthanol.

Elle est aussi représentée par des quantités importantes de diglycérides et de monoglycérides.

— Le méthanol enfin entraîne encore un peu de cholestérol et des mono et diesters du glycérol.

Le fractionnement sur colonne d'acide silicique, utilisant, selon BARRON et HANAHAN (14), des mélanges d'hexane, de benzène et d'éther, nous a montré les résultats suivants, après chromatographie des résidus lipidi-

ques sur papier imprégné d'acide silicique dans le solvant heptane-diisobulylcétone (96 p. — 6 p.) (Figure 31) :

— L'hexane seul n'a entraîné qu'une petite fraction de triglycérides.

— La fraction II contient la quasi totalité des triglycérides et une petite quantité d'acides gras libres.

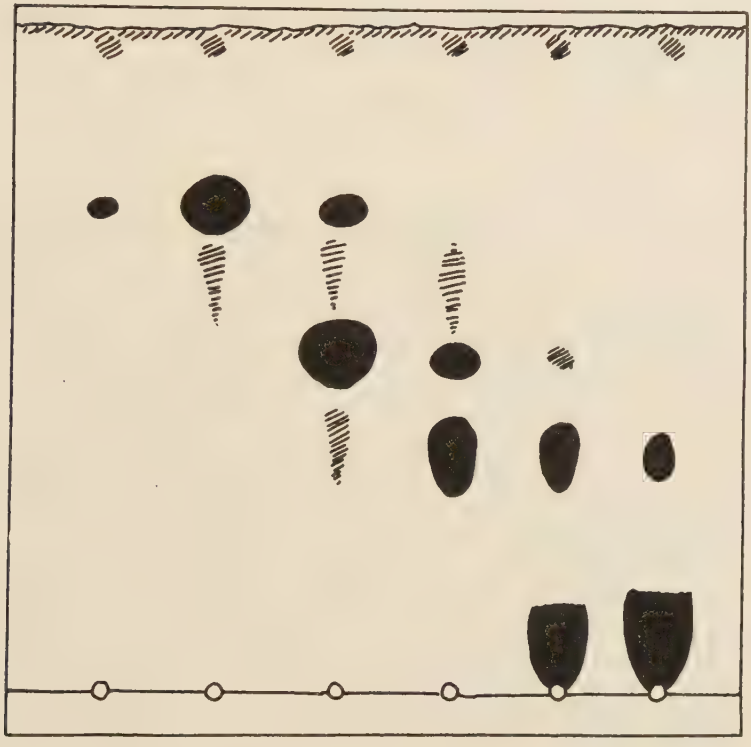

Figure 31

Chromatogramme des lipides non phosphorés de globules rouges sur papier imprégné d'acide silicique, après chromatographie sur colonne et élution par des mélanges d'hexane, de benzène et d'éther.

— La fraction III contient encore un peu de triglycérides, des acides gras libres et la majorité du cholestérol libre.

La fraction IV contient un peu de cholestérol et surtout des diglycérides.

— La fraction V contient des diglycérides et des monoglycérides.

— L'éther enfin entraîne surtout des monoglycérides et encore un peu de diglycérides.

En conclusion, ces techniques de chromatographie sur colonne d'acide silicique nous ont permis de fractionner les lipides non phosphorés de globules rouges humains en :

— triglycérides, cholestérol libre, acides gras libres, diglycérides et monoglycérides.

Elles confirment l'absence de cholestérol estérifié.

4 - Chromatographie sur colonne d'alumine

La présence de cholestérol estérifié dans les extraits lipidiques d'hématies, reconnue par quelques auteurs, a été par contre violemment critiquée par d'autres dont nous avons cité les travaux. Pour élucider ce problème, nous avons utilisé la chromatographie sur colonne d'alumine selon la technique d'AGNERAY (1) et élué les lipides par des mélanges de chloroforme, d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle.

Les résultats de ce fractionnement, contrôlés par chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique dans le solvant heptane-heptanone (96 p. — 6 p.), suivie de coloration par la réaction de Liebermann, nous ont montré (Figure 32) que :

— La fraction I ne présente pas de coloration.

— La fraction II présente une tache importante de Rf = 0,40, représentant le cholestérol libre.

— La fraction III ne présente aucune coloration.

Le Rf des esters de cholestérol dans ce système de chromatographie est de 0,85 — 0,90 ; n'ayant pas de coloration à ce niveau, nous pouvons conclure à l'absence d'esters de cholestérol dans les extraits de lipides globulaires. Des travaux de MAGGIONI (180), dont nous avons eu tout récemment connaissance, confirment entièrement ces résultats.

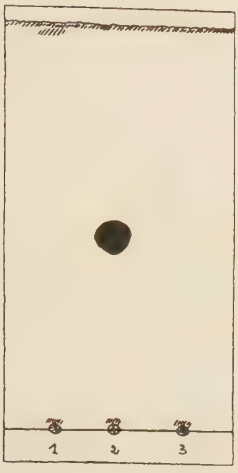

Figure 32

Chromatogramme sur papier imprégné d'acide silicique des lipides de globules rouges, après chromatographie sur colonne d'alumine (Coloration par la Réaction de LIEBERMANN)

5 - Distribution à contre-courant

Nous avons identifié dans les extraits lipidiques d'hématies d'individus normaux, six fractions différentes; le résultat de ce fractionnement est montré dans la figure 24 :

1) Deux d'entre elles (I et II) sont entraînées par la phase éthéro-chloroformique et ne renferment pas de phosphore.

2) Les quatre autres (III à VI) sont solubles dans la phase polaire et phosphorées.

— La fraction I renferme de faibles quantités de cholestérol et d'esters d'acides gras (environ 3 % de la totalité des esters) présentes dans les tubes de CRAIG 43 à 50. Il doit s'agir ici de glycérides et peut-être de stérides. Nous avons vu que la présence de cholestérol estérifié dans les hématies est très contestée. ERICKSON (79) estime leur valeur à 16 % du cholestérol total, par contre des travaux plus récents de FORMIJNE (86) et de MARINETTI et REED (243) ont montré que les

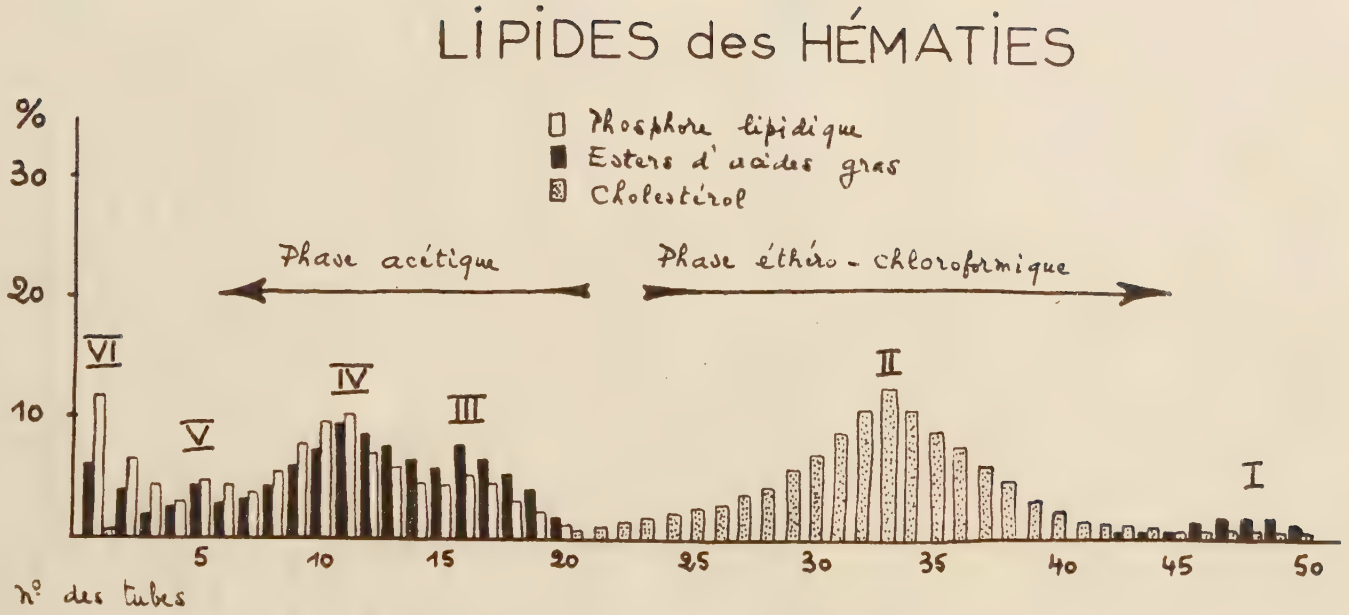

Figure 24 Fractionnement des lipides globulaires après distribution à contre-courant

esters de cholestérol étaient absents du globule rouge. Le fait que nous ne retrouvions pas, comme dans le sérum, où les stérides sont présents, un sommet de cholestérol en tête des phases légères, nous a fait conclure à l'absence d'esters de cholestérol.

— La fraction II représente la totalité du cholestérol libre, elle est comprise dans les tubes 21 et 50 et présente un maximum au tube 33.

Les quatre fractions solubles dans les solvants polaires sont toutes quatre phosphorées mais se différencient par leur teneur en phosphore, par leur rapport esters d'acides gras/phosphore, par la nature de leurs constituants azotés et la présence ou non de phosphatides sous la forme d'acétals.

— La fraction III est caractérisée par un taux de phosphore de 22 à 28 % du phosphore total, un rapport esters d'acides gras/P supérieur à 2 (entre 2 et 3 suivant les cas), une très faible quantité ou même une absence de choline, la présence au contraire de sérine et d'éthanolamine, un indice d'iode relativement peu élevé (compris entre 10 et 15) et la présence de plasmalogènes.

La chromatographie sur papier à contre-courant effectuée sur les résidus lipidiques des tubes de Craig correspondant à cette fraction montre la présence d'une seule tache entraînée par la phase éthérochloroformique, de Rf nul, colorée par le Noir Soudan et la dinitrophénylhydrazine (DNPH). Le Rf nul de cette fraction correspond à celui des céphalines; la détermination des bases azotées nous a montré la présence d'éthanolamine et de sérine. Les céphalines globulaires sont donc un mélange de phosphatidyléthanolamines et de phosphatidylsérines. Le fait que nous obtenions une tache à la 2-4 dinitrophénylhydrazine montre que ces céphalines existent en partie au moins sous forme d'acétals.

MARINETTI (187) signale des résultats comparables pour des phospholipides de mitochondries de foie de rat.

Parmi les bases azotées de cette fraction nous avons identifié également un peu de choline, ce qui montre une séparation imparfaite entre la fraction céphalinique et la fraction suivante (IV).

— La fraction IV contient de 30 à 55 % du phosphore total, elle a un rapport esters d'acides gras/P voisin de 2, des quantités équimoléculaires de choline et de phosphore, un indice d'iode voisin de 35 et donne à la 2-4 dinitrophénylhydrazine une coloration positive des plasmalogènes. Ces caractères sont ceux des lécithines.

La chromatographie sur papier à contre-courant confirme la présence d'un phospholipide cholinique existant en partie ou en totalité sous forme d'acétal. La tache obtenue est entraînée par la phase acétique ; son Rf est voisin de 0,70. Elle se colore par l'acide phosphomolybdique, le réactif de HANES et ISHERWOOD et par la dinitrophynylhydrazine.

— La fraction V contient de 20 à 25 % du phosphore total ; elle a un rapport esters d'acides gras/P voisin de 1, un indice d'iode voisin de 30.

La chromatographie sur papier à contre-courant de cette fraction nous a permis de mettre en évidence deux taches de Rf = 0,70 et 0,80. Ces deux lipides sont choliniques, un seul (celui de Rf = 0,70) donne un test positif à la DNPH.

Ces caractères laissent supposer que les lipides de cette fraction sont un mélange de sphingomyélines et de lécithines.

La distribution à contre-courant réalisée sur 20 tubes laisse persister un chevauchement des parties IV et V qui sont incomplètement séparées.

Malgré cette imperfection, la technique que nous venons de décrire nous a permis de mettre en évidence

des lécithines, des sphingomyélines et des céphalines, ces dernières pouvant exister à la fois sous forme d'esters et d'acétals.

— La dernière fraction (VI) présente le caractère très particulier d'être très soluble dans les solvants polaires ; elle est même soluble dans l'eau.

Elle représente de 5 à 10 % du phosphore total ; elle a un rapport esters d'acides gras/P voisin de l'unité, et renferme des quantités équimoléculaires de choline et de phosphore.

Sur cette fraction la réaction à la DNPH est négative.

Par chromatographie sur papier à contre-courant ce lipide migre avec la phase acétique (son Rf est de 0,70) ; il se colore par le Noir Soudan et l'acide phosphomolybdique.

Ces caractères sont ceux des lysocithines.

L'existence dans les tissus et surtout dans le sang de ces composés hémolytiques que sont les lysophosphatides a été mise en doute, par Laser (154) en particulier ; pourtant l'éventualité de leur présence dans de nombreux tissus et organes est aujourd'hui reconnue.

Nous avons essayé de vérifier la présence de tels composés en cherchant à mettre en évidence le pouvoir hémolytique de cette fraction. Nous avons appliqué le test d'hémolyse au résidu lipidique de chacun des tubes du fractionnement à contre-courant en le reprenant par 2 ml de sérum physiologique et en ajoutant 1 goutte d'une suspension d'hématies de mouton lavées fraîches.

Dans ces conditions, seul des 20 tubes, la fraction VI donne une hémolyse nette, les autres tubes ne changent pas d'aspect.

Au cours de leur étude sur les propriétés et caractères de migration électrophorétique et chromatographique de lysocithines isolées du plasma humain, Douste-Blazy et Valdiguié (277) s'étaient demandé si cette fraction hémolytique ne renfermait pas uniquement des phospholipides modifiés dans leur structure, hydrolysés par exemple au cours de la distribution à contre-courant.

Il est possible qu'elle renferme de tels lipides.

Nous sommes simplement en mesure d'affirmer son pouvoir hémolytique.

Reste à connaître la nature de cette substance hémolytique. Nous nous sommes tout d'abord attaché à éliminer l'hypothèse de la nature non lipidique de cette substance. La fraction VI dans ce but a été dialysée puis électrodialysée (après que l'extrait lipidique lui-même ait subi ces opérations). L'hémolyse s'est encore manifestée.

Douste-Blazy (67) s'était attaché à montrer que l'hémolyse n'était pas due à la présence de sels biliaires qui auraient pu exister dans le plasma liés à des lécithines. Cette hypothèse semble pouvoir être rejetée car les sels biliaires sont plus solubles dans la phase éthérochloroformique que dans la phase acétique. Il est logique de penser qu'après 50 passages de phase légère ces substances sont entièrement entraînées.

Quel est donc l'état de cette substance dans les lipides sanguins ou tissulaires ? Il semble que l'on puisse envisager une forme « liée » et c'est ce qu'envisage Douste-Blazy (66) étant donné, et cela est une condition physiologique nécessaire, qu'un extrait de lipides globulaires ne présente en lui-même aucun pouvoir hémolytique.

La fraction insoluble dans l'acétone pas plus que la fraction soluble dans l'acétone ne présentent de propriétés hémolytiques.

Dans l'hématie comme dans les autres tissus il pourrait exister, à l'état normal, un élément de protection, un inhibiteur de la lysocithine. Et certains processus pathologiques, les phénomènes d'hémolyse en particulier, seraient peut-être déclenchés par une levée de cette inhibition, libérant les lysocithines par un moyen qui nous semble à l'heure actuelle encore méconnu en laissant apparaître un pouvoir hémolytique.

Ce facteur de protection est entraîné après un certain nombre de transferts par les phases éthérochloroformiques. Le passage sur le premier tube de six fois 5 ml. de phase éthérochloroformique suffit à entraîner le facteur anti-hémolytique.

Parmi les substances rapidement entraînées par la phase légère, le cholestérol pourrait représenter le facteur antihémolytique.

Mais si le cholestérol peut représenter l'un des agents protecteurs de la lysocithine, il n'est pas le seul facteur antihémolytique car si l'on sépare par chromatographie sur papier le cholestérol et les stérides de la fraction des lysocithines, cette dernière n'est pas hémolytique.

Il existerait donc un autre facteur antihémolytique qui au cours de la chromatographie resterait « uni » à la lysocithine. Ce facteur pourrait être constitué par les phosphatidylcholines qui possèdent cette faculté de protection contre l'hémolyse, par le froid en particulier. Turner (273) a attiré l'attention sur l'importance de certains lipides globulaires dans le phénomène de l'hémolyse, montrant tout d'abord une résistance plus faible à l'hémolyse des hématies dépourvues de lécithines. L'hypothèse du pouvoir antihémolytique des lécithines a été retenue également par Lea, Rhodes et Stoll (157) à propos d'ovolécithines.

D'autre part l'hémolyse due à des facteurs physiques, en particulier à un abaissement brutal de la température, est réduite si l'on ajoute dans le milieu ambiant des lécithines.

L'addition des lécithines aurait donc pour effet de protéger les hématies contre l'hémolyse. Le mécanisme de ce processus est-il dû à une combinaison lécihines-lysocithines ?

Nous ne sommes pas en mesure de répondre à cette question.

La chromatographie à une dimension dans le solvant acétique (acide acétique, méthanol, eau, saturée d'éther de pétrole-chroroforme), révèle la migration d'une tache hémolytique de Rf voisin de 0,70 (en boîte de Pétri de gélose au sang il apparaît un halo d'hémolyse).

La chromatographie dans le butanol saturé d'eau divise la fraction hémolytique en deux taches de Rf voisins de 0,70 et 0,90, colorées au Noir Soudan et à l'acide phosphomolybdique qui ne sont ni l'une ni l'autre hémo-

lytiques. Tout se passe comme si la fraction était dédoublée en deux lipides phosphorés, choliniques, non hémolytiques.

L'étude de la fraction hémolytique par électrophorèse sur papier en tampon véronal de pH = 8,6 nous a montré l'existence d'un lipide phosphoré, cholinique, hydrosoluble et de caractère particulier puisque migrant sous l'influence du courant. Ce lipide entraîne avec lui, comme en témoigne la coloration à la ninhydrine, des peptides ou des acides aminés.

En conclusion nous paraissons être en mesure d'affirmer que cette fraction hémolytique est bien de nature lipidique, elle est hydrosoluble, phosphorée, cholinique. Ces caractères sont ceux d'une lysocithine qui serait entraînée sous l'influence du courant électrique par les peptides ou les acides aminés auxquels elle est liée.

Notre travail basé sur la distribution à contre-courant et sur la chromatographie sur papier à contre-courant, nous a permis d'identifier parmi les lipides de l'hématie humaine normale :

1° Des céphalines, caractérisées par leur migration chromatographique, par la présence de sérine et d'éthanolamine. Elles possèdent un rapport esters d'acide gras/phosphore, supérieur à 2 (2.5 à 3 selon les cas).

2° Un mélange de phospholipides probablement des sphingomyélines et des lécithines mal séparées les unes des autres, d'indice d'iode très voisin (35 pour la fraction IV, 30 pour la fraction V), un rapport esters d'acide gras/phosphore légèrement plus bas pour V et une migration différente en chromatographie sur papier.

3° Une fraction de caractère hémolytique ayant en chromatographie sur papier les mêmes caractères de migration que les lécithines et possédant un rapport esters d'acide gras/phosphore voisin de l'unité.

4° Une fraction représentée par du cholestérol libre constituant la totalité du cholestérol des héma-

ties. Il n'y aurait pas dans l'hématie d'esters du cholestérol.

5° Enfin une fraction non phosphorée renfermant une petite quantité d'esters d'acide gras que nous attribuons à la présence de glycérides.

Dans les résultats de la distribution à contre-courant des lipides globulaires et des lipides plasmatiques nous ne noterons que de légères différences de répartition en soulignant que ces différences ne portent pas sur la nature des lipides mais simplement qu'elles sont dues au fait que ces lipides ont dans les deux compartiments sanguins des proportions différentes.

La répartition des lipides dans la technique que nous avons utilisée est influencée comme nous l'avons fait remarquer et comme l'avait mentionné Olley (209) par la présence d'autres substances et par leur taux.

La fraction céphalinique des globules, en accord d'ailleurs avec de nombreux auteurs et en particulier Reed et Marinetti (243) est plus importante que dans le plasma. Inversement les lysocithines sont moins abondantes dans l'hématie.

Enfin nous n'avons pas retrouvé dans l'hématie les phospholipides de caractère acétono-soluble dont l'existence avait été mentionnée par Douste-Blazy (67) dans le sérum et qui se trouvaient entraînés avec les glycérides et les stérides par la phase éthéro-chloroformique.

Peut-être ces phospholipides de caractère particulier puisque solubles dans l'acétone, sont-ils des acides phosphatidiques dont Polonovski (222) a reconnu le rôle primordial dans la biosynthèse des phospholipides et dont l'existence semble être méconnue dans l'hématie, pour les raisons que nous avons déjà signalées.

A la lumière de notre expérience par distribution à contre-courant, hématies et plasma renfermeraient des lipides voisins, sans doute même identiques, possédant des caractères de solubilité comparables, mais présents à des taux différents.

6 - Électrophorèse des lipoprotéines globulaires

Dans les conditions électrophorétiques que nous avons décrites et en colorant les bandes par l'amidoschwarz et le Noir Soudan, les stromas globulaires, obtenus par hémolyse avec une solution aqueuse de saponine à 1 g. par litre, révèlent :

— deux fractions lipoprotéiques :
l'une, rapide, migrant comme les α lipoprotéines plasmatiques; l'autre, plus lente, migrant, comme les β lipoprotéines plasmatiques.

— une troisième fraction soudanophile, plus importante que les précédentes, n'ayant aucune propriété de migration, à ce pH, et restant au point de dépôt des stromas.

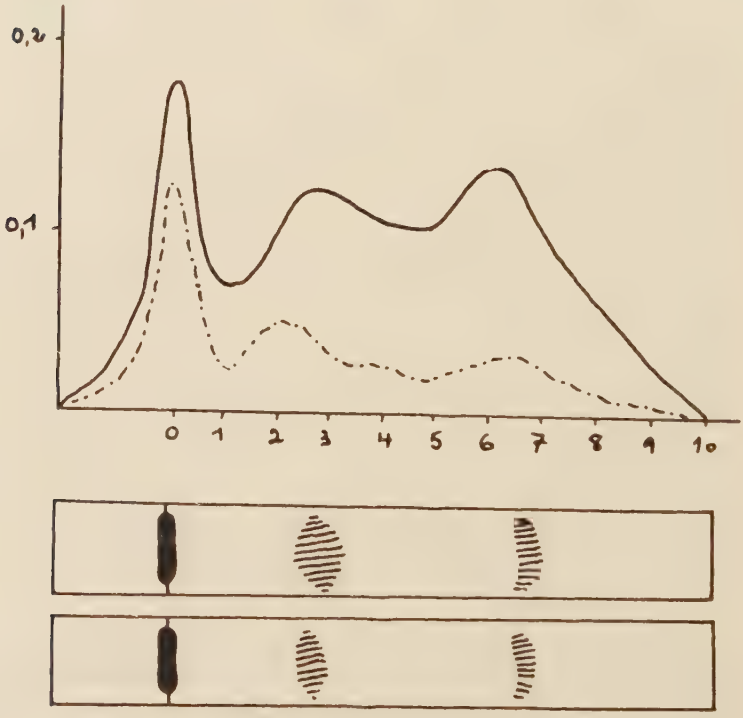

Figure 33

Diagramme électrophorétique des lipoprotéines globulaires

— Coloration à l'amidoschwartz
.-.- Coloration au noir soudan

Nous montrons ci-dessous le diagramme d'enregistrement de la migration électrophorétique des lipoprotéines d'hématies normales (Figure 33).

Ces lipoprotéines sont très rapidement dénaturées, bien plus rapidement que les lipoprotéines plasmatiques. Leur conservation quelques jours, même au froid, ne permet plus d'obtenir de migrations.

7 . Lipides globulaires au cours de « l'hémolyse successive », in vitro

La membrane globulaire est constituée d'associations lipoprotéiques qui rassemblent 60 % environ des lipides totaux de l'hématie.

La majorité de ces lipides est rassemblée à la périphérie de la cellule.

L'isolement des lipides globulaires et l'étude des lipoprotéines sont conditionnés par l'action initiale d'agents dénaturants, dont la plupart sont hémolytiques.

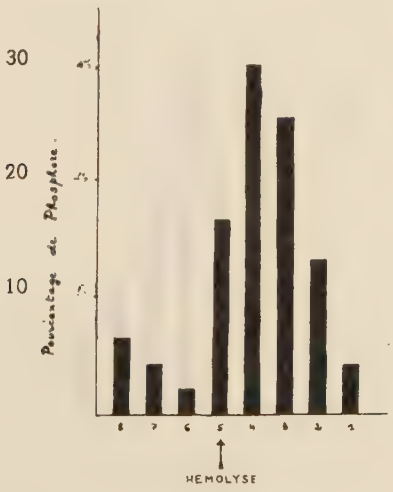

Figure 34

Fractionnement chromatographique des lipides d'hémolyse par les solutions chlorurées sodiques hypotoniques

Nous nous sommes demandés si l'hémolyse n'arrachait pas des lipides au stroma et, en particulier, l'hémolyse réalisée à l'aide de solutions chlorurées sodiques hypotoniques de concentration progressivement décroissante.

Danon (56) mentionne la perte d'une lipoprotéine dans des milieux de force ionique faible et la désintégration du stroma au cours de l'hémolyse graduelle par des solutions aqueuses hypotoniques.

Lovelock (165), de son côté, affirme que les lavages successifs de globules rouges par des solutions de chlorure de sodium 0,16 M à 37° entraînent une perte de lipoprotéines et de lipides évaluée à 10 % de la totalité.

Ponder (234) considère, à son tour, qu'une concentration en chlorure de sodium inférieure à 0,015 M, « concentration critique », entraîne des modifications du stroma, dues à une dénaturation des protéines et à une perte de lipides.

A l'opposé, Hillier et Hoffman (114), traitant successivement des globules rouges par des solutions chlorurées sodiques 0,03 M, puis 0,015 M et enfin 0,008 M,

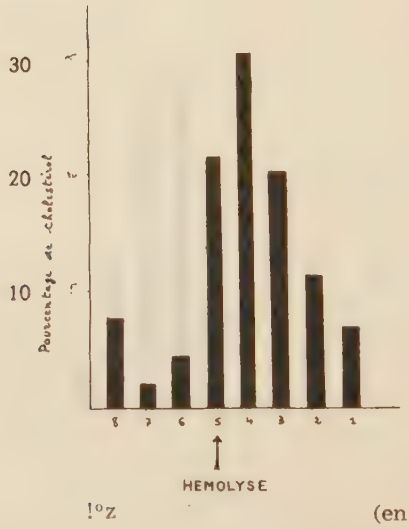

Figure 35

Fractionnement chromatographique des lipides d'hémolyse par les solutions chlorurées sodiques hypotoniques

prétendent que le stroma reste intact, qu'il est débarrassé de son hémoglobine et qu'il n'y a eu perte, ni de protéines, ni de lipides.

A la suite de ces résultats contradictoires, nous avons voulu étudier l'action sur le globule rouge de solutions chlorurées sodiques hypotoniques qui provoquent une hémolyse et peut-être une dénaturation des lipoprotéines.

Les hématies, séparées du plasma dès le prélèvement, sont lavées trois fois au sérum physiologique pour éliminer tout constituant plasmatique.

Dix ml de ces globules lavés sont mis au contact pendant 15 minutes de 10 fois leur volume de solution chlorurée sodique à 8 g. par litre. La même opération est répétée sept fois avec des solutions de concentrations décroissantes allant de 7 g. à 1 g. par litre.

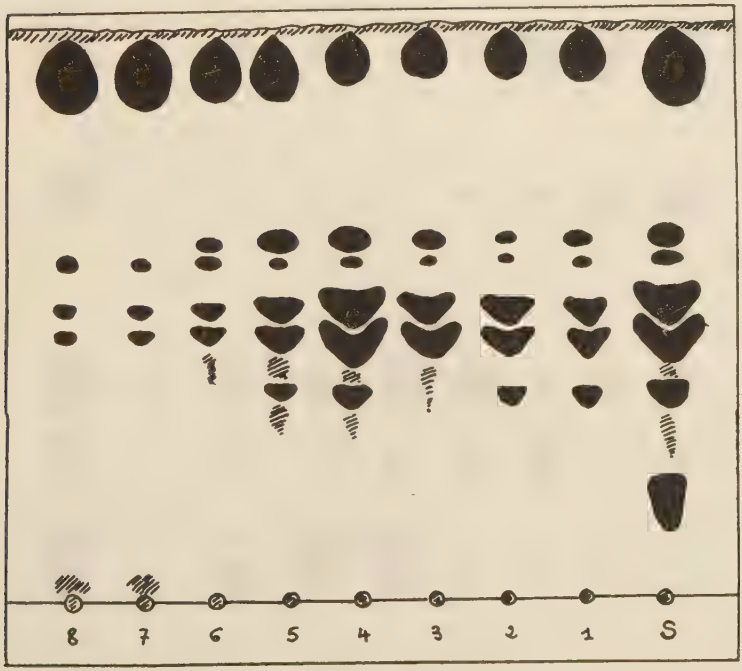

Figure 36

Chromatographie des phospholipides obtenus après hémolyse par les solutions chlorurées sodiques hypotoniques
(de 8 à 1 = concentration en g. ‰ de Cl Na
S = résidus cellulaires)

Chaque fois, après centrifugation, les liquides surnageants sont recueillis et lyophilisés.

Les lipides sont extraits des résidus de lyophilisation par l'alcool et l'éther selon la méthode de HEWITT (112) ou par le chloroforme et le méthanol selon la technique de POLONOVSKI (213).

Les dosages combinés du phosphore et du cholestérol ont montré le passage dans les liquides de lavage et les hémolysats de phospholipides, de glycérides et de cholestérol.

Ces résultats, rassemblés dans les schémas 34 et 35 nous montrent, estimés en pourcentage de la totalité, les quantités de phosphore et de cholestérol retrouvés dans les liquides de lavage et les hémolysats.

Ces résidus lipidiques, dissous dans l'alcool et l'éther,

Figure 37

Chromatographie des lipides non phosphorés obtenus après hémolyse par les solutions chlorurées sodiques hypotoniques
(de 8 à 1 = concentration en g. ‰ de Cl Na
R. C. = résidus cellulaires)

ou le chloroforme et le méthanol, soumis à la chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique :

— dans le solvant heptanone-acide acétique-eau (40-25-5) ;

— dans le solvant heptane-heptanone (96-6)

ont permis l'étude comparative des divers lipides présents.

Les figures 36 et 37 représentent les chromatogrammes des phospholipides et des lipides non phosphorés.

En conclusion, l'action sur les hématies normales, de solutions chlorurées sodiques hypotoniques montre :

1° Une perte globale des phospholipides et de cholestérol évaluée à 20 % de la totalité.

2° Avant l'hémolyse, la diffusion :

— d'une petite quantité de phospholipides représentés par des lécithines, sphingomyélines et céphalines ;

— d'une petite quantité de monoglycérides, de diglycérides et de cholestérol et d'une quantité plus importante de triglycérides.

3° Dès l'hémolyse (chlorure de sodium à 5 g par litre) un passage :

— de phospholipides, en plus grande quantité, représentés par des lysocithines, des sphingomyélines, des lécithines, des céphalines ;

— de lipides non phosphorés : monoglycérides, diglycérides, cholestérol libre.

4° Un maximum de perte lipidique pour la concentration de 4 g par litre.

L'action des solutions cholurées sodiques hypotoniques, appliquée pour l'obtention des stromas, présente donc, un effet néfaste sur les lipoprotéines globulaires. Elle ne peut être retenue pour l'étude de ces constituants.

Peut-être, les lavages préalables des hématies au sérum physiologique, qui nous servent à éliminer les constituants plasmatiques, enlèvent-ils déjà une partie des lipides propres du globule.

B - Hematies falciformes

L'anémie drépanocytaire se caractérise par la présence d'hématies en forme de faucilles, chez des individus de race noire n'apparaissant pas in vivo dans des conditions normales mais lorsque les cellules sont soumises à une diminuttion de la tension en oxygène, en haute altitude en particulier.

Il est possible d'obtenir ces aspects en faucille, comme l'a montré PONDER (224) par l'addition aux globules rouges d'un agent réducteur comme le métabisulfite de sodium.

L'élément qui subit la transformation en faucille ne serait pas le drépanocyte en entier mais un fragment de la cellule et même un fragment du stroma.

L'hémoglobine ferait partie intégrante de la membrane globulaire, les stromas d'hématies falciformes contiendraient un surplus d'hémoglobine, une plus grande quantité d'hémoglobine serait retenue par les lipoprotéines de la membrane.

Cette hémoglobine existerait en effet en association avec les lipoprotéines de la membrane, et PONDER (226) a pensé que le mécanisme de la falciformation pourrait dépendre du complexe hémoglobine-lipoprotéine qui serait anormal comme l'est le composant hémoglobine.

Sur le plan biochimique, nos connaissances sur les hématies falciformes sont bien embryonnaires. Nous savons qu'elles possèdent une hémoglobine anormale, l'hémoglobine S, qui représente 50 % de la totalité de son pigment. Ses propriétés électrophorétiques diffèrent de celles de l'hémoglobine normale adulte.

Leur composition lipidique a été peu étudiée.

Le mécanisme de la maladie sicklanémique réside-t-il dans un trouble d'origine lipidique ou dans une malformation de la structure lipoprotéique des hématies ?

C'est dans le but de mieux connaître l'origine de cette affection que nous avons entrepris l'étude de la composition lipidique des drépanocytes.

1. Dosages chimiques.

Les déterminations combinées des lipides totaux, du phosphore et du cholestérol de ces hématies nous apportent quelques éléments sur leur composition lipidique, ceux-ci sont résumés dans le tableau ci-contre :

Tableau 38

COMPOSITION LIPIDIQUE DES HEMATIES FALCIFORMES
(en mg pour 100 ml d'hématies)

	Hématies normales	*Hématies falciformes*
Lipides totaux	400	300 350 400
Cholestérol total	180	120 150 157
Phospholipides	180	157 200 214

Ces hématies nous montrent des taux sensiblement normaux de lipides totaux, des phospholipides normaux ou très légèrement augmentés ; par contre le cholestérol semble légèrement abaissé.

2. Propriétés électrophorétiques des stromas.

Nous avons étudié le comportement électrophorétique des stromas obtenus à partir d'hématies de malades sicklanémiques (*) et nous l'avons comparé à celui de stromas obtenus dans les mêmes conditions à partir de globules normaux.

Pour obtenir ces membranes, les globules rouges, après séparation du plasma, sont lavés à trois reprises au sérum physiologique pour enlever toute trace de constituants plasmatiques. Ils sont ensuite hémolysés par cinq fois leur volume de solution de saponine à 1 g par litre.

(*) Il nous est agréable de remercier vivement le Professeur Neuzil qui a eu l'obligeance de nous faire parvenir quelques échantillons de drépanocytes de Dakar.

Nous continuons à les traiter quatre nouvelles fois par la solution de saponoside. Dès ce moment les stromas ont perdu une grande partie de leur hémoglobine ; un plus grand nombre de lavages rend les stromas plus blancs, mais peut entraîner des modifications de leurs lipoprotéines et une perte de constituants lipidiques dans les hémolysats.

Ces stromas, en suspension dans du sérum physiologique sont soumis à l'action du champ électrique contre un tampon véronal de pH = 8,6 dans nos conditions opératoires habituelles.

Les migrations des stromas d'hématies falciformes semblent comparables à celles de stromas de globules normaux (Figure 39).

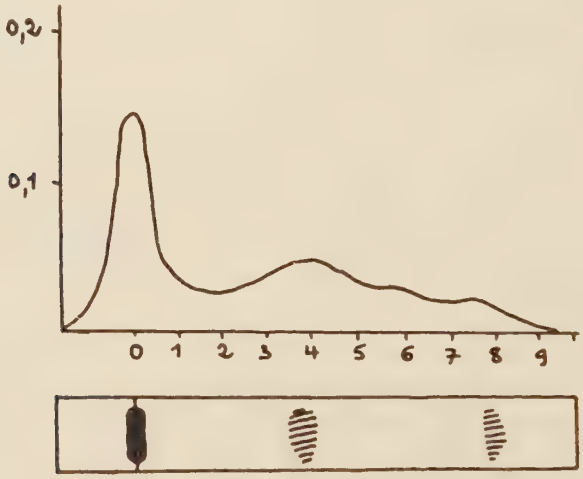

Figure 39

Diagramme des lipoprotéines d'hématies falciformes après coloration au noir soudan

Une fraction importante, colorée au Noir Soudan, reste au point de départ ; une autre fraction migre comme les β-lipoprotéines plasmatiques.

La fraction de lipoprotéines rapides est beaucoup moins importante que les deux premières.

Ces lipoprotéines se dénaturent plus rapidement que les lipoprotéines plasmatiques ; après un séjour de 48 h.

à 4° ces stromas ne donnent plus aucune migration électrophorétique.

3. Chromatographie des éluats d'électrophorèse.

Les fractions obtenues par électrophorèse ont été éluées séparément par le méthanol aqueux puis le chloroforme. Les lipides extraits de chacune des fractions ont été chromatographiés sur papier imprégné d'acide silicique.

La fraction qui ne migre pas à l'électrophorèse renferme les mêmes lipides que l'extrait total sauf les céphalines (Figure 40).

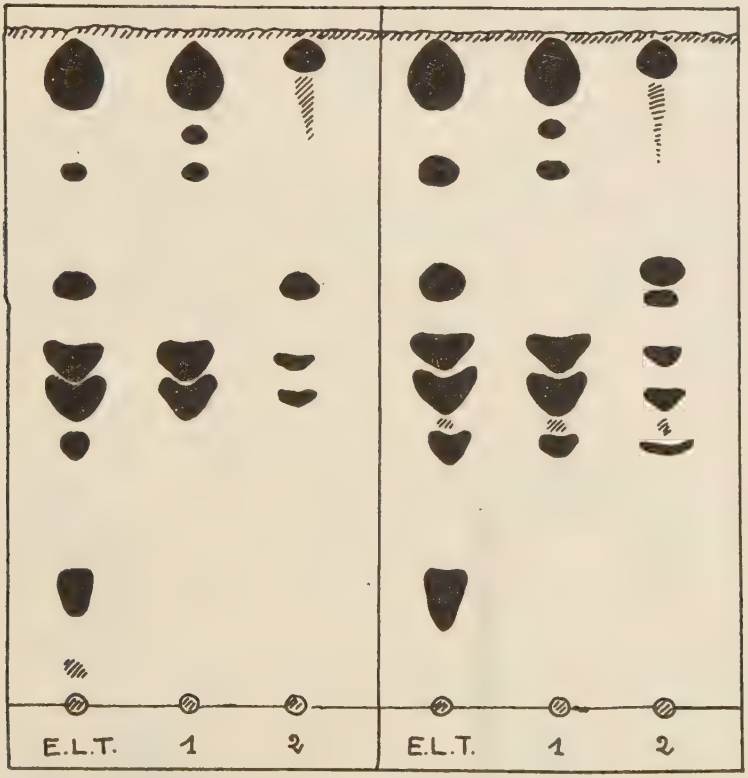

Figure 40

Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique des lipides obtenus après élution des bandes d'électrophorèse
1 — Fraction ne migrant pas
2 — Fraction qui migre
E.L.T. = Lipides totaux

La fraction qui migre nous a montré une tache de lysocithines ; lécithines et sphingomyélines y sont moins abondantes que dans la fraction précédente. Nous retrouvons ici la totalité des céphalines parfois divisées en deux taches qui représentent les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylsérines.

Les lipides non phosphorés y sont aussi moins abondants que dans la fraction ne migrant pas.

4. Chromatographie sur colonne d'acide silicique.

Les lipides globulaires de malades sicklanémiques ont été fractionnés sur colonne d'acide silicique en utilisant la séquence de solvants déjà décrite pour le fractionnement des lipides d'hématies normales.

La répartition des divers phospholipides dans chacune des fractions est suivie par le dosage du phosphore et par la chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique, dans le solvant heptanone-acide acétique-eau (40-25-5).

L'ensemble des résultats que nous apportent (Figures 41 et 42) le dosage du phosphore dans chacune de

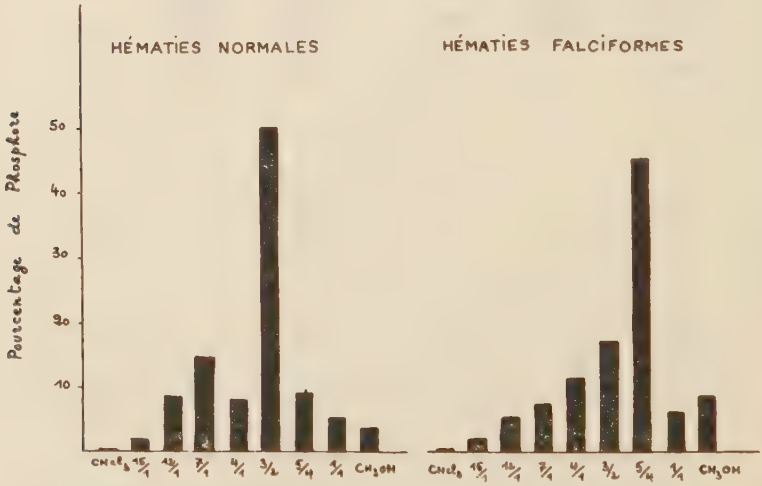

Figure 41

Fractionnement des phospholipides d'hématies normales et falciformes

ces fractions et la chromatographie sur papier imprégné des phospholipides présents, nous ont amené à penser en comparant ces résultats à ceux obtenus pour les lipides de globules rouges normaux, que les hématies falciformes présentent :

— une teneur plus faible en phosphatidyléthanolamines et phosphatidylsérines, localisées dans les fractions 15/1, 12/1, et 7/1 ;

— une tache plus importante dans la fraction 15/1, au-dessous des céphalines qui représente peut-être des acides phosphatidiques ;

— une quantité plus élevée de lysocithines dans la fraction méthanolique, décelée à la fois par un plus grand pourcentage de phosphore et par une tache plus importante de Rf = 0,25, en chromatographie sur papier ;

Figure 42

Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique des lipides d'hématies falciformes

— Nous noterons d'autre part une teneur peut-être plus faible des phosphatidylcholines et un déplacement du sommet phosphoré de la fraction 3/2 à la fraction 5/4, cette dernière éluant ensemble les lécithines et les sphingomyélines.

Nous retrouvons donc dans les lipides d'hématies falciformes des différences quant à la répartition des divers phospholipides. Peut-être la teneur plus faible en céphalines ou la teneur diminuée des lécithines et au contraire le taux plus élevé des lysocithines sont-ils une des causes de la malformation des parois cellulaires dans ces hématies. Ce trouble phospholipidique est-il la cause de la tendance à la malformation et l'explication du fait que les stromas retiennent davantage d'hémoglobine que les stromas normaux, comme l'a signalé PONDER (230) ?

Nous ne sommes pas en mesure de répondre affirmativement.

Nous nous proposons de poursuivre ces recherches par l'étude comparée de la composition lipidique des hématies d'homozygotes et d'hétérozygotes. Nous envisageons aussi l'étude du comportement des lipoprotéines des hématies falciformes au cours de « l'hémolyse successive » in vitro réalisée à l'aide des solutions chlorurées sodiques hypotoniques, de concentration progressivement décroissante.

Peut-être des nouvelles recherches auxquelles nous nous attacherons, nous apporteront-elles une plus grande connaissance de la structure et des propriétés de ces hématies.

CONCLUSIONS

L'analyse des globules rouges humains normaux et falciformes, l'étude du devenir des divers lipides au cours de l'hémolyse hypotonique, nous montrent les résultats suivants :

I - L'hématie normale.

La distribution à contre-courant, la chromatographie sur colonne d'acide silicique et la chromatographie sur papier, nous ont permis de fractionner :

A - Les phospholipides en :

— lécithines ;

— céphalines ;

— sphingomyélines et lysocéphalines ;

— lysocithines.

B - Les lipides non phosphorés en :

— triglycérides ;

— mono et diglycérides ;

— acides gras libres :

— cholestérol libre.

Ces diverses techniques ont confirmé l'absence de cholestérol estérifié.

L'électrophorèse des lipoprotéines globulaires isole deux fractions, de proriétés électrophorétiques et de composition lipidique différentes.

II. - L'hématie falciforme.

La chromatographie sur colonne et sur papier imprégné d'acide silicique nous ont permis :

— de retrouver les mêmes individualités lipidique ;
— de montrer une diminution des phosphatidyléthanolamines et des phosphatidylsérines.

III. - L'hémolyse par des solutions chlorurées sodiques progressivement hypotoniques, entraîne un passage lipidique dans des hémolysats.

Les phospholipides migrent avant l'hémoglobine.

Parmi les lipides non phosphorés, les triglycérides sont les premiers à quitter le stroma.

Dès l'hémolyse, une quantité de phospholipides et de cholestérol sont décelés hors des hématies.

BIBLIOGRAPHIE

1. Agneray (J.) — Microdosage du cholestérol libre et estérifié dans le sérum. *Ann. Biol. Clin.*, 1958, 16, 563.
2. Ahrens (E.H.). — Application of countercurrent distribution to the study of lipids. Biochemical Problems of lipids, *Butterworths Scient. Public., London,* 1956, 30.
3. Allen (R.J.C.). — The estimation of phosphorus. *Biochem. J.*, 1940, 34, 858.
4. Allison (A.C.), Kates (M.) et James (A.T.). — An abnormality of blood lipids in hereditary spherocytosis. *British Med. J.*, 1960, 1767.
5. Altman (K.I.), Watman (R.N.) et Salomon (K). — The incorporation of α C^{14} acetate into the stroma of the erythrocyte. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1951, 33, 168.
6. Altman (K.I.). — The in vitro incorporation of α C^{14} acetate into the stroma of the erythrocytes. *Arch. of Biochem. Biophys.*, 1953, 42, 478.
7. Altman (K.I.) et Swisher (S.N.). — Incorporation of acetate 2 C^{14} into human erythrocyte stroma as a function of storage. *Nature,* 1954, 174, 459.
8. Artom (C.). — Cephalins, choline-containing phospholipids, and total phospholipids in normal human plasma. *J. Biol. Chem.*, 1941, 139, 65.
9. Artom (C.). — Some data on distribution of individual phospholipids in rat tissues and in human plasma. *J. Biol. Chem.*, 1945, 157, 585.
10. Axelrod (J.), Reichental (J.) et Brodie (B.B.). — The direct determination of phosphatidylethanolamines and phosphatidylserines in plasma and red blood cells. *J. Biol. Chem.*, 1953, 204, 903.
11. Ayrault-Jarrier (M.). — Action des détergents sur une β lipoprotéine isolée du sérum humain. *Thèse de Sciences,* Paris, 1959.
12. Baer (E.). — Phosphatide analogs. The synthesis of glycollecithins and bis (glycol) phosphatidic acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 5533.
13. Ballentine (R.) et Parpart (A.K.). — Action of lipase on red cell surface. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1940, 16, 49.
14. Barron (E.J.) et Hanahan (D.J.). — Observation on the silicic acid chromatography of the neutral lipids of rat liver, beef liver and yeast. *J. Biol. Chem.* 1958, 231, 493.

15. Barry (G.), Sato (Y.) et Craig (L.C.). — Distribution studies XII. Separation and estimation of the higher normal fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 1951, 188, 299.

16. Bauer (F.) et Hirsch (E.). — A new method for the colorimetric determination of the esterified fatty acids in human sera. *Arch. of Biochem.*, 1949, 20, 242.

17. Bergenhem (B.) et Farhaeus (R.). — Uber spontane hämolysin bildung in blut unter besonderer. Bëruck sichtigung des physiologie der milz. *Z. Ges. Exptl Med.*, 1936, 97, 555.

18. Bernhard (B.). — Electron microscope studies on thin sections of human erythrocytes. *Nature*, 1952, 170, 359.

19. Bessis (M.). — La méthode de l'ombrage appliquée au frottis de sang. *Rev. Hématol.*, 1949, 4, 95.

20. Bessis (M.) et Bricka (M.). — Nouvelles études sur les cellules sanguines au microscope électronique avec une étude particulière de leur ultrastructure. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, 1949, 38, 190.

21. Bessis (M.) et Bricka (M.). — Etude au microscope électronique sur l'hémolyse, l'agglutination, la forme et la structure des globules rouges. *Rev. Hématol.*, 1950, 5, 396.

22. Bessis (M.), Bricka (M.) et Dupuy (A.). — Examen au microscope électronique de la surface des globules rouges. Origine des hématexodies. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, 145, 1509.

23. Bevan (T.), Gregory (G.), Malkin (T.) et Poole (A.G.). — Chromatographic separation of choline countaining phospholipides from phospholipide mixture. *J. Chem. Soc.*, 1941, 841.

24. Biserte (G.) et Havez (R.). — Enquête sur l'électrophorèse des lipoprotéines. *Ann. Biol. Clin.*, 1960, 18, 689.

25. Bloor (W.). — A method for the determination of fat in small amount of blood. *J. Biol. Chem.*, 1914, 17, 377.

26. Bloor (W.). — A method for the determination of « lecithin » in small amounts of blood. *J. Biol. Chem.*, 1915, 22, 133.

27. Bloor (W.). — Biochemestry of fatty acids and their compounds : the lipids. *Reinold*, New-York, 1949, p. 45.

28. Borgström (B.). — Investigation on lipid separation methods. Separation of cholesterol esters, glycerides and free fatty acids. *Acta Physiol. Scandin.*, 1952, 25, 101.

29. Borgström (B.). — Investigation on lipid separation methods. Separation of cholesterol esters glycerides and free fatty acids. *Acta Physiol. Scandin.*, 1952, 25, 111.

30. Boyd (E.M.). — Low phospholipid values in dog plasma. *J. Biol. Chem.*, 1951, 91, 1.

31. Boyd (E.M.). — Extraction of lipids from red blood cells. *J. Biol. Chem.*, 1936, 115, 37.

32. Brante (G.). — Studies on lipids in nervous system with special reference to quantitative chemical determination and tropical distribution. *Acta Physiol. Scandin.*, 1949, 18, 1.

33. Brante (G.). — Iodine as a means of development in paper chromatography. *Nature*, 1949, 163, 651.

34. Briggs (A.P.). — A modification of the Bell-Doisy phosphate method. *J. Biol. Chem.*, 1922, 53, 13.

35. Brown (E.A.). — The absorption of lipids from the erythrocyte surface by silica and alumina. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1957, 50, 49.

36. Brun (G.). — Cholesterol content of the red blood cells in man. *Acta Med. Scandin.* Suppl., 1939, 99, 3.

37. Bruns (F.) et Rummel (W.). — *Biochem. Z.*, 1930, 321, 197.

38. Burchard (H.). — *Chem. Zentr.*, 1890, 1, 25. In Douste-Blazy (L.), *Thèse de Sciences,* Toulouse, 1955.

39. Burger (M.) et Beumer (H.). — Uber die phosphatide der erythrocyten stromata bei hammel und menschen. *Biochem. Z.*, 1913, 56, 446.

39 *bis*. Burton (R.M.) et Howard (R.E.). — Studies on the structure and synthesis of central nervous system glycolipids. *V^e Congrès Intern. Biochimie, Moscou,* 1961.

40. Calvin (M.), Evans (R.S.), Behrendt (V.) et Calvin (G.). — Rh antigen and hapten. Nature of antigen and its isolation from erythrocyte stroma. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1946, 61, 416.

41. Carter (B.B.). — Preliminary report on substance which inhibits anti-Rh serum. *Ann. J. Clin. Path.*, 1947, 17, 646.

42. Carter (B.B.) et Harris (J.C.). — Specificity of anti-Rh serum inhibition by lipid extracts as determined by quantitative nitrogen assays. *Experientia,* 1956, 12, 150.

43. Carter (B.B.). — Studies of lipid extracts from red blood cells. *Experientia,* 1957, 13, 367.

44. Cartier (P.) et Leroux (J.P.). — Les enzymes des erythrocytes. *Ann. Biol. Clin.*, 1962, 20, 273.

44 *bis*. Cazal (P.). — Erythrocytes et Erythropathies. *Masson,* Paris, 1957.

45. Chargaff (E.), Levine (C.) et Green (C.).— Technic for the demonstration by chromatography of nitrogenous lipid constituents, sulfur containing, amino-acids, and reducing sugars. *J. Biol. Chem.*, 1948, 175, 67.

46. Clark (E.C.), Lathe (G.V.) et Ruthven (C.R.). — Fractionation of lipids which inhibit haemagglutination. *Brit. J. Exp. Path.*, 1953, 34, 542.

47. Cole (P.), Lathe (G.) et Ruthven (C.). — Application of countercurrent method to fractionation of lipid material from brain. *Biochem. J.*, 1953, 54, 449.

48. Consden (R.), Gordon (H.) et Martin (H.). — Qualitative analysis of protein. *Biochem. J.*, 1944, 38, 224.

48 *bis*. Condrea (E.), Livni (E.), Berwald (J.) et de Vries (A.). — Changes in red blood cells fragilities due to the action of phosphatidase and lipoprotein-lipase on human blood in vitro. *Arch. Intern. Pharmacodynamie,* 1961, 134, 368.

49. Cormier (M.), Jouan (P.) et Girre (L.). — Séparation des lipides par chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique. Possibilité et limite de la méthode. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, 41, 1037.

50. Craig (L.C.). — Identification of small amounts of organic compounds by distribution studies. Application to atebrin. *J. Biol. Chem.*, 1943, 150, 33.

51. Craig (L.C.). — Identification of small amounts of organic compounds by distribution studies. *J. Biol Chem.*, 1944, 155, 519.

52. Craig (L.C.). — Counter-current distribution and some of its applications. *Fortshr. Chem. Forsh.*, 1949, 1, 292.

53. Craig (L.C.) et Post (O.). — Apparatus for counter-current distribution. *Anal. Chem.*, 1949, 21, 500.

54. Dandliker (W.B.), Moskowits (M.),Zimm (B.) et Calvin (M.). — The physical properties of elenin : a lipoprotein of human erythrocytes. *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, 72, 5587.

55. Danielli (J.F.). — *Cytology and Cell. Physiology*, p. 68, in *Bourne G., Oxford*, 1942.

56. Danon (D.), Nevo (A.) et Marikowski (Y.). — Preparation of erythrocyte ghosts by graduàl hemolysis in hypotonic aqueous solution. *Bull. Res. Council Israel*, 1956, 6, 36.

57. Dawson (R.M.C.), Hemington (N.) et Lindsay (D.B.). — The phospholipids of erythrocyte ghosts of various species. *Biochem. J.*, 1960, 77, 226.

58. Dawson (R.M.C.). — A note on the estimation of sphingomyelins in nervous tissues. *Biochem. J.*, 1954, 56, 621.

59. Delsal (J.L.) et Manhouri (H.). — Etude comparative des dosages colorimétriques du phosphore. Recherche d'une méthode de haute sensibilité applicable au dosage du phosphore organique dans les spots après chromatographie. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, 37, 1047.

60. Dervichian (D.G.) et Magnant (C.). — Formation de figures myéliniques par des mélanges de composés à chaîne longue et de composés polycycliques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, 28, 419.

61. Dervichian (D.G.). — Structural aspect of lipoprotein association *Trans Faraday Soc. Discussion*, 1949, 6, 7.

62. De Vries (A.), Condrea (E.), Gitter (S.), Danon (R.), Katchalsky (R.), Kesoler (J.) et Kochwa (S.). — Crenation of erythrocytes and inhibition of rouleau formation in human blood, correlated with the activity of lipoprotein-lipase. *Le Sang*, 1960, 31, 289.

63. Dieckert (J.W.) et Reiser (R.). — A paper chromatographic procedure for separating 1 mono, 1-3 di, triglyceride, cholesterol and cholesterol esters. *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, 1956, 33, 123.

64. Dittmer (J.C.) et Hanahan (D.J.). — Long chain fatty acids (I), observation (II), metabolic studies. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 1983.

65. Douste-Blazy (L.), Polonovski (J.) et Valdiguié (P.). — Fractionnement des lipides par chromatographie de partage à contre-courant sur papier. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, 235, 1643.

66. Douste-Blazy (L.). — Fractionnement des lipides du sérum par distribution à contre-courant. *C. R. Acad. Sci.*, 1954, 239, 460.

67. Douste-Blazy (L.). — Contribution à l'étude analytique des phospholipides du plasma. *Thèse de Sciences Naturelles*, Toulouse, 1955.

68. Douste-Blazy (L.), Polonovski (J.) et Valdiguié (P.). — Fractionnement chromatographique des lipides sanguins. Etude des phospholipides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, 38, 27.

69. Douste-Blazy (L.), Polonovski (J.) et Valdiguié (P.). — Chromatographie sur papier des phospholipides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, 38, 19.

70. Douste-Blazy (L.), Polonovski (J.) et Valdiguié (P.). — Les phospholipides plasmatiques, biochimie, physiopathologie, fractionnement. *Pathol. Biol.*, 1958, 6, 1513.

71. Douste Blazy (L.), Soula (G.) et Valdiguié (P.). — Fractionnement des phospholipides des globules rouges humains. *IV^e Congrès International de Bioch., Wien, Pergamon Press, London*, 1959, p. 13.

71 *bis*. Douste-Blazy (L.). — Les lipides des hématies. *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1959, p. 187.

72. Douste-Blazy (L.). — Les lipides du globule rouge. *Ann. Biol. Clin.*, 1962, 20, 97.

73. Drabkin (D.L.). — Hemoglobin, glucose, oxygen and water in erythrocyte : concept of biological magnitudes based upon molecular dimensions. *Science*, 1945, 101, 445.

74. Druez (G.), Lamy (H.), Frezal (J.), Polonovski (J) et Rey (J.). — Acanthocytose. Sa relation avec l'absence congénitale de β lipoprotéine. *Presse Méd.*, 1961, 69, 1546.

75. Ducos (J.) et Marty (Y.). — Essai d'absorption de certains anticorps par des hématies hémolysées. *Rev. Et. Clin. Biol.*, 1959, 4, 48.

76. Eckler (N.E.), Taylor (C.B.), Campbell (D.J.), Gould (R.G.), Keegan (P.), Kelly (F.B.), Davis (C.B.) et Lotenser (J.). — Origin of plasma cholesterol and the rates of equilibration of liver, plasma and erythrocyte cholesterol. *J. Lab. Clin. Med.*, 1956, 46, 359.

77. Engstrom et Fineau (J.B.). — Biological Ultrastructure. *Academic Press*, New-York, 1958.

78. Erickson (B.N.), Williams (H.H.), Hummel (F.C.) et Macy (I.G.). — Lipid and mineral distribution in the serum and erythrocytes of normal children. *J. Biol. Chem.*, 1937, 118, 15.

79. Erickson (B.N.), Williams (H.H.), Bernstein (S.S.), Avrin (I.), Jones (R.I.) et Macy (I.G.). — Lipid distribution of posthemolytic residue or stroma of erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 1938, 122, 515.

80. Favarger (P.). — Participation of phospholipides in the absorption of fats from different regions of the intestine of dog. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 1949, 7, 371.

81. Fillerup (D.L.) et Mead (J.F.). — Chromatographic separation of plasma lipids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1953, 83, 574.

82. Fiske (C.H.) et Subbarow (Y.). — The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 1925, 66, 375.

83. Folch (J.) et Van Slyke (D.). — Nitrogenous contaminants in petroleum ether extracts of plasma lipids. *J. Biol. Chem.*, 1939, 129, 539.

84. Folch (J.) et Van Slyke (D.). — Preparation of blood lipid extracts free from non-lipid extractives. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1939, 41, 514.

85. Folch (J.), Lees (M.) et Sloane-Stanley (G.M.). — A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 497.

86. Formijne (P.), Poulie (N.J.) et Rodbard (J.A.). — Determination of phospholipide fraction in the human erythrocytes. *Clin. Chim. Acta*, 1957, 2, 25.

87. Frey-Wisling (A.). — Submicroscopic morphology of protoplasma and its derivatives. *New-York, Elsevier*, 1953.

88. Furchgott (R.F.). — *Cold Spring Harbor Symp Quant. Biol.* 1940, 18, 224.

89. Furchgott (R.F.) et Ponder (E.). — Disk-sphere transformation in mammalian red cells : nature of antisphering factor. *J. Exp. Biol.*, 1940, 17, 117.

90. Gertler (H.M.), Kream (J.) et Baturay (O.). — Studies on the phosphatide content of human serum. *J. Biol. Chem.*, 1954, 207, 165.

91. De Gier (J.) et Van Deenen (L.L.M.). — Some lipid characteristic of red cell membranes of varial animal species. *Bioch. Biophys. Acta*, 1961, 49, 286.

92. De Gier (J.), Mulder (I.) et Van Deenen (L.L.M.). — On the specific lipid composition of red cell membranes. *Naturwiss.*, 1951, 48, 54.

93. Goldsmith (D.P.J.) et Muschett (C.W.). — Lipid anticoagulants. I - Assays in vitro. *J. Biol. Chem.*, 1954, 211, 163.

94. Gorter (E.). — Protein films. *Trans. Faraday Soc.*, 1937, 33, 1125.

95. Gough (A.). — The nature of the red blood corpuscle. *Biochem J.*, 1924, 18, 202.

96. Groulade (J.) et Ollivier (C.). — Coloration des lipoprotéines par le noir cérol B. *Ann. Biol. Clin.*, 1960, 18, 577.

98. Haag (W.). — Contribution à la technique de l'électrophorèse des lipoprotéines. *Ann. Biol. Clin.*, 1956, 14, 465.

99. Hack (M.). — Some observation concerning sphingomyelin and sphingomyelin reineckate. *J. Biol. Chem.*, 1946, 166, 455.

100. Hack (M.). — A new histochemical technique for lipides applied to plasma. *Anal. Rec.*, 1952, 112, 275.

101. Hack (M.). — Analysis of lipids by spot tests on filter paper disk chromatograms. *Biochem. J.*, 1953, 54, 602.

102. Hahn (L.) et Hevesy (G.). — Phosphatide exchange between plasma and organs. *Nature*, 1939, 144, 204.

103. Hakomori (S.I.) et Jeanloz (R.W.). — Isolation and characterization of glycolipids from erythrocytes of human blood A (+) and B (+). *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 2827.

104. Hanahan (D.J.) et Jayko (M.). — The isolation of dipalmitoleyl - l - glyceryl-phosphorylcholine from yeast. A new route to (dipalmitoyl) - l - lecithin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 74, 5070.

105. Hanahan (D.J.), Watts (R.M.) et Pappajohn (D.). — Some chemical characteristics of the lipids of human and bovine erythrocytes and plasma. *J. Lipid Research*, 1960 1, 421.

106. Hanes (C.S.) et Isherwood (F.A.). — Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatograms. *Nature*, 1949, 164, 1107.

107. Hausman (W.) et Craig (L.C.). — Counter-current distribution of serum albumine. *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 2703.

108. Harris (I. M.), Prankerd (T. A. J.) et Westerman (M. P.). — Abnormality of phospholipides in red cells of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Brit. Med. J.*, 1957, 11, 1276.

109. Harrop (W.A.) et Barron (E.S.G.). — Studies on blood cell metabolism. The effect of methylene blue and other dyes upon the

oxygen consumption of mammalian and avian erythrocytes. *J. Exp. Med.*, 1928, 48, 207.

110. Harvey (E.N.) et Danielli (J.F.). — Propèrties of the cell surface. *Biol. Rev.*, 1938, 13, 319.

111. Hevesy (G.) et Atem (A.H.W.). — Kgl. Dauske Visdeukab. Selskab. *Biol. Medd.*, 1949, 14, 5.

112. Hewitt (L.H.). — Optical rotary power and dispersion of proteins. *Biochem. J.*, 1927, 21, 216.

113. Hill (V.). — Colorimetric determination of fatty acids and esters. *Anal. Chem.*, 1947, 19, 932.

114. Hillier (J.) et Hoffman (J.F.). — On the ultrastructure of the plasma membrane as determined by the electron microscope. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1953, 42, 203.

115. Hirsh (J.) et Ahrens (E.H.). — Effects of dietary fats on serum lipids level in man. *J. Biol. Chem.*, 1958, 233, 311.

116. Hokin (M.R.) et Hokin (L.E.). — Evidence for phosphatidic acids in animal tissues. *J. Biol Chem.*, 1958, 233, 800.

117. Hokin (L.E.) et Hokin (M.R.). — Evidence for phosphatidic acid as the sodium carrier. *Nature*, 1958, 184, 1068.

118. Holley (R.W.), Doctor (B.P.), Merill (S.H.) et Saad (F.M.). — Counter-current distribution of rat liver "soluble" fraction ribonucleic acids. *Bioch. Biophys. Acta*, 1959, 35, 273.

119. Holley (R.W.) et Merill (S.H.). — Counter-current distribution of an active ribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, 81, 753.

120. Hoppe-Seyler (F.) et Oppenheimer (C.). — Handbuch des biochimie fisher. *Iena*, 1910, p. 260.

121. Howe (C.). — The influenza virus receptor and blood group antigens of human erythrocyte stroma. *J. Immun.*, 1951, 66, 9.

122. Jacobs (M.H.), Classmann (H.N.) et Parpart (A.K.). — Osmotic properties of the erythrocytes. VII - The temperature coefficient of certain hemolytic processes. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1935, 7, 197.

123. Jacobs (M.H.), Glassmann (H.N.) et Parpart (A.K.). — Hemolysis and zoological relationship comparative studies with four penetrating non-electrolytes. *J. Exp. Zool.*, 1950, 113, 277.

124. James (A.T.) et Lovelock (J.E.). — The blood lipids and the clearing factor. *Paleis der Academiën, Brussel*, 1957, p. 94.

125. James (A.T.), Lovelock (J.E.) et Webb (J.P.W.). — Essentials fatty acids. Butterworths. *Scientifics Publication*, London, 1958, p. 72.

126. James (A.T.), Lovelock (J.E.) et Webb (J.P.W.). — The lipids of whole blood. Lipid biosynthesis in human blood in vitro. *Biochem. J.*, 1959, 73, 106.

127. Jarrier (M.) et Polonovski (J.). — Méthode de dosage des acides gras estérifiés et son application au sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, 37, 495.

128. Jorpes (E.). — Protein component of the erythrocyte membrane or stroma. *Biochem. J.*, 1932, 26, 1488.

129. Jung (D.). *Ges. W.*, 1953, 1558. — In Booij (H.L.) et Bungenberg de Jong (H.G.). — Protoplasmatologia, I, 2, *Springer*, Vienna, 1956.

130. Jung (D.) *Ges. W.*, 1954, 773. — In Booij (H.L.) et Bungenberg de Jong (H.G.). — Protoplasmatologia, I, 2, *Springer*, Vienna, 1956.

131. Jung (F.). — Fine structure of erythrocytes. *Folia Haematologica*, 1955, 73, 401.

132. Jung (F.), Wendler (J.) et Wiegershausen (B.). — Hemolysis by soap-like substances. *Exp. Path. Pharmack.*, 1956, 229, 281.

133. Kates (M.), Allison (A.C.) et James (A.T.). — Phosphatides of human blood cells and their role in spherocytocis. *Bioch. Biophys. Acta*, 1961, 48, 571.

134. Kathen (H.). — *Arch. Mikrobiol.*, 1950, 14, 602. In Borgström (B.) *Acta Physiol. Scandin.*, 1952, 25, 111.

135. Kawamoto (J.) et Fujika (M.). — Separation and characterization of actinomycin that contains alloisoleucine. *Med. J. Osaka Univ.*, 1958, 8, 737.

136. Kennedy (E.P.). — Metabolism of lipides. *Ann. Rev. Biochem.*, 1957, 26, 119.

137. Kersten (H.D.) et Zucker (T.F.). — *Am. J. Physiol.*, 1928, 87, 274. In Douste-Blazy (L.). — Les lipides des hématies. *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1959.

138. King (E.J.). — Colorimetric determination of phosphorus. *Biochem. J.*, 1932, 26, 292.

139. Kirk (E.). — Concentration of individual phosphatides (lecithin, kephalin, ether-insoluble phosphatide) and of cerebrosides in plasma and red blood cells, in pernicious anemia before and during liver treatment. *Am. J. Med. Sci.*, 1938, 196, 648.

140. Kirk (E.). — The concentration of lecithin, cephalin, ether-insoluble phosphatide and cerebrosides in plasma and red blood cells or normal adults. *J. Biol. Chem.*, 1938, 123, 637.

141. Kirk (E.). — Micromethod for determination of cerebrosides and of individual phosphatides (ether-insoluble phosphatides, lecithin and kephalin) in plasma, red blood cells and tissues. *Acta Med. Scand. Suppl.*, 1938, 89, 178.

142. Kirshner (L.B.). — Phosphatidylserine as a possible participant in active sodium transport in erythrocytes. *Arch. Biochim. Biophys.*, 1957, 68, 499.

143. Kirshner (L.B.). — The cation content of phospholipides from swine erythrocytes. *J. Gen. Physiol.*, 1958, 42, 231.

144. Klenk (E.) et Lauenstein (K.). — Sugar-containing lipids of erythrocyte stroma. *Z. Physiol. Chem.*, 1951, 288, 220.

145. Klenk (E.) et Lauenstein (K.). — Uber die zuckerhaltigen lipoide des erythrocyten stroma von mensch und rind. *Z. Physiol. Chem.*, 1952, 291, 249.

146. Klenk (E.) et Lauenstein (K.). — Glycolipids and sphingomyelin from the stroma of horse erythrocytes. *Z. Physiol. Chem.*, 1953, 295, 164.

147 *bis*. Klibansky (C.) et Osini (Z.). — Chromatographic analysis of für das influenzavirus. *Z. Physiol. Chem.*, 1957, 307, 278.

147 *bis*. Klibansky (C.) et Osini (Z.). — Chromatographic analysiis of red blood cell phospholipids on silicic acid impregnated paper. *Bull. Res. Council Israel*, 1961, 9, 143.

148. Kliptein (F.A.) et Ranney (H.M.). — Electrophoretic components of the hemoglobin of red cell membranes. *J. Clin. Invest.*, 1960, 39, 1894.

149. Kögl (F.), de Gier (J.), Mulder (I.) et Van Deenen (L.L.M.). — Metabolism and function of phosphatides. Specific fatty acid composition of the red blood cell membranes. *Bioch. Biophys. Acta*, 1960, 43, 95.

150. Lamy (M.), Frezal (J.), Polonovski (J.) et Rey (J.). — Absence congénitale de β lipoproteine. *Presse Med.*, 1961, 69, 1511.

151. Lands (W.E.M.). — Metabolism of glycerolipids, enzymic acylation of lysolecithin. *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 2233.

152. Landsteiner (K.) et Witt (D.H.). — Observation on human isoagglutinins. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1923, 24, 389.

153. La Roche (G.). — *Thesis*, Washington, 1957. In Barron (E.J.) et Hanahan (D.J.), *J. Biol. Chem.*, 1958, 231, 493.

154. Laser (H.). — Isolement d'une substance hémolytique à partir de tissus animaux et du plasma et ses propriétés biologiques. *J. Physiol.*, 1950, 110, 338.

155. Latta (H.). — The surface of the mammalian erythrocyte. On electron microscope study of the effect of lipid solvents, fixatives, hypotonocity and hemolysin (amboceptor) and complement. *Blood*, 1952, 7, 508.

156. Lawrence (J.H.), Erf (L.A.) et Tuttle (L.W.). — Intracellularbestrahlung. *J. Appl. Physics*, 1941, 12, 333.

157. Lea (C.H.), Rhodes (D.N.) et Stoll (R.). — Phospholipids. 3 - On the chromatographic separation of glycerophospholipids. *Biochem. J.*, 1955, 60, 353.

158. Lea (C.H.) et Rhodes (D.N.). — Partition chromatography of eggyold phospholipins on cellulose. *Biochem. J.*, 1953, 54, 467.

159. Levine (C.) et Chargaff (E.). — *Feder. Proc.*, 1949, 8, 219. In Douste-Blazy (L.,) *Thèse de Sciences*, Toulouse, 1955.

160. Levine (C.) et Chargaff (E.). — Procedure for the microestimation of nitrogenous phosphatide constituents. *J. Biol. Chem.*, 1951, 192, 465.

161. Lieberman (C.). — Ueber das oxychinoterpen. *Ber.*, 1885, 18, 1803.

162. London (I.M.) et Schwartz (H.). — Erythrocyte metabolism. The metabolic behaviour of the cholesterol of human erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, 1953, 32, 1248.

163. Long (C.) et Penny (I.F.). — The structure of naturally occuring phospho-glycerides. Action of mocasin venom phospholipase A on ovolecithin and related substances. *Biochem. J.*, 1957, 65, 382.

164. Lovelock (J.E.). — Physical instability and thermal shock in red cells. *Nature*, 1954, 173, 659.

165. Lovelock (J.E.). — The physical instability of human red blood cells. *Biochem. J.*, 1955, 60, 692.

166. Lovelock (J.E.), James (A.T.) et Rowe (C.E.). — The lipids of whole blood. 2 - The exchange of lipids between the cellular constituents and the lipoproteins of human blood. *Biochem. J.*, 1960, 74, 137.

167. Lovern (J.). — The application of counter-current distribution to the separation of phospholipids. *Biochem. J.*, 1952, 51, 464.

168. Lungsgaard (E.). — Die glycolyse Erged, Enzym forsh., 1933, 2, 179.

169. Machebœuf (M.). — Recherche sur les phosphoaminolipides et les stérides du sérum et du plasma ; étude physicochimique de la fraction protéique la plus riche en phospholipides et en stérides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, 11, 485.

170. Machebœuf (M.). — Recherche sur les phosphoaminolipides et les stérides du sérum et du plasma sanguin ; entraînement des phospholipides, des stérides et des diverses fractions au cours du fractionnement des protéides du sérum. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, 11, 268.

171. Machebœuf (M.). — Etat des lipides de la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique, Paris, 1937, Hermann Ed.

172. Machebœuf (M.) et Vanaud (H.). — Etude sur l'électrophorèse des cénapses lipidoprotidiques du sérum sanguin. Les cénapses acido-précipitables. *C. R. Soc. Biol.*, 1941, 135, 1249.

173. Machebœuf (M.), Delsal (J.), Lepine (P.) et Giunhini (J.). — Research on the state of cholesterol esters and of phosphatides in blood serum. Study on the homogeneity of the phosphatide steride proteins by ultracentrifugation and by electrophoresis. *Ann. Inst. Pasteur*, 1943, 69, 321.

174. Machebœuf (M.) et Delsal (J.). — Sur le dosage de très petites quantités de phosphore dans des matières organiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, 25, 116.

175. Mac Glone (B.). — *Am. J. Med. Sci.*, 1926, 172, 155. In Douste-Blazy (L.). — Les lipides des hématies. *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1959.

176. Mac Farren (E.) et Mills (J.A.). — Determination of amino acids on filter paper chromatograms by direct photometry. *Anal. Chem.*, 1952, 24, 650.

177. Mac Guire (T.) et Earle (F.). — Fractionation of linseed phosphatides. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1951, 28, 328.

178. Mac Kibbin (J.) et Taylor (W.). — The nitrogenous constituents of the tissue lipids. Extraction, purification, hydrolysis of tissue lipids. *J. Biol. Chem.*, 1949, 178, 17.

179. Mac Kibbin (J.) et Taylor (W.). — Isolation of a polyglycerol phosphatide from the alcohol-insoluble phosphatides of dog liver. *J. Biol. Chem.*, 1952, 196, 427.

180. Maggioni (G.), Bottini (E.), Joppolo (C.) et Antognoni (G.). — Contributo alla conoscenza di alcune frazioni lipidiche degli eritrociti umani. *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1960, p. 904.

181. Marinetti (G.V.) et Stotz (E.). — Studies on the structure of sphingomyelin. IV - Configuration of the double bond in sphingomyelin and related lipids and a study of their infra-red spectra. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 1347.

182. Marinetti (G.V.) et Stotz (E.). — Studies on the structure of sphingomyelin. III - Quantitative data on the peroxide and periodate uptake during the oxidation of sphingomyelin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 1345.

183. Marinetti (G.V.) et Stotz (E.). — Paper chromatographic separation of phospholipids. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 6668.

184. Marinetti (G.V.) et Stotz (E.). — Chromatography of phosphatides on silicic acid impregnated paper. *Bioch. Biophys. Acta*, 1956, 21, 168.

185. Marinetti (G.V.), Erbland (J.) et Kochen (J.). — Quantitative chromatography of phosphatides. *Feder. Proc.*, 1957, 16, 837.

186. Marinetti (G.V.), Kochen (J.), Erbland (J.) et Stotz (E.). — Lipid composition of purified cytochrome preparation of pig heart. *J. Biol. Chem.*, 1957, 229, 1027.

187. Marinetti (G.V.), Erbland (J.), Albrecht (M.) et Stotz (E.). — The application of chromatographic methods to study of incorporation of ^{32}P labelled orthophosphate into the phosphatides of rat liver homogenates. *Bioch. Biophys. Acta*, 1957, 25, 585.

188. Marinetti (G.V.), Erbland (J.), Albrecht (M.) et Stotz (E.). — In vitro incorporation of ^{32}P labelled orthophosphate into the phosphatides of isolated rat liver mitochondria. *Bioch. Biophys. Acta*, 1957, 26, 130.

189. Marinetti (G.V.), Scaramuzzino (D.J.) et Stotz (E.). — Lipides of cytochrome oxydase. *J. Biol. Chem.*, 1957, 224, 819.

190. Marinetti (G.V.), Erbland (J.) et Stotz (E.). — Phosphatides of pig heart cell fractions. *J. Biol. Chem.*, 1958, 223, 562.

191. Marinetti (G.V.) et Stotz (E.). — Direct chromatography of serum lipids without solvent extraction. *Bioch. Biophys. Acta*, 1960, 37, 571.

192. Marinetti (G.V.), Erbland (J.), Albrecht (M.) et Stotz (E.). — Time study of incorporation in vivo of ^{32}P orthophosphate into phosphatides of rat tissues. *Bioch. Biophys. Acta*, 1958, 30, 543.

193. Masamune (H.), Hakomori (S.), Numabe (H.), Akawa (Z.) et Kamiyawa (S.). — Synthesis of artificial group A and B substance. *Tohoku J. Exp. Med.*, 1955, 61, 283.

194. Matsumoto (M.). — The chemistry of the of post-hemolytic residue or stroma of erythrocytes. VII. Studies on chondrosamine-containing glycolipid and sphingomyelin of hog blood stroma. *J. Biochem.* (Japon), 1956, 43, 53.

195. Matsumoto (M.). — Studies on phospholipids. I. - Comparative analysis of phospholipids from mammalian blood stroma and spleen. *J. Biochem.*, 1961, 49, 11.

196. Mead (J.F). et Fillerup (D.). — Plasma lipids in fat deficiency. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1954, 86, 449.

197. Mitchison (J.N.). — Thickness and structure of the membrane of the human red cell ghost. *Nature*, 1950, 166, 347.

198. Mitchison (J.N.). — A polarised light analysis of the human red cell ghost. *J. Exp. Biol.*, 1953, 31, 1.

198 *bis*. Monnier (A.M.) et Monnier (A.). — L'imbibition anormale des dérivés lipidiques porteurs de groupes ionisables. *J. Physiol.*, 1962, 54, 381.

199. Monnier (A.M.), Blozovski (D.) et Monnier (A.). — L'impédance électrique des membranes lipidiques porteuses de groupes ionisables. *J. Physiol.*, 1962, 54, 379.

200. Moskowitz (M.), Dandliker (W.B.), Calvin (M.) et Evans (R.S.). — Studies on the antigens of human red cells. I. - The separation from human erythrocytes of a water soluble fraction containing the Rh A and B factors. *J. Immunol.*, 1950, 65, 383.

201. Moskowitz (M.) et Calvin (M.). — On the components and structure of the human red cell membrane. *Exp. Cell. Research.*, 1952, 3, 33.

202. Muir (H.M.), Perrone (J.C.) et Popjak (G.). — Studies on the metabolism of the circulating erythrocyte in the rabbit. *Biochem. J.*, 1951, 48, 5.

203. Mukherjee (S.), Achaya (K.T.), Deuel (H.J.) et Alfin-Slatter (R.B.). — Nature of the lipides in rat blood. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 845.

204. Munn (J.L.) et Crosby (W.H.). — Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Evidence of defect of red cell stroma manifested by abnormalities of lipides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1957, 96, 481.

205. Munn (J.L.). — Studies of lipids in human red cells. *Brit. J. Hematol.*, 1958, 4, 344.

206. Nicolaides (N.) et Foster (R.C.). — Esters in human hair fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1956, 33, 404.

207. Nowotny (A.). — A, B, and O blood group antigens. II. - Effect of proteolytic systems on the blood group antigens of erythrocyte membrane. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 1955, 8, 25.

207 *bis*. Nowotny (A.). — Studies of the chemical structure of A, B and O blood group antigens. I. - Physicochemical examination of the A and B group red cell stroma. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 1955, 7, 31.

208. Nowotny (A.) et Backhausz. — Chemical structure of A, B, and O blood group antigens. III. - The role of the erythrocyte membrane lipides in group specificity. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 1957, 12, 53.

209. Olley (J.). — Application of counter-current distribution to phospholipide chemestry. *Chem. Ind.*, 1956, 1120.

210. Pastucci (O.) et Deuel (H.J.). — *The lipids, Inter sciences, New-York*, 1951, p. 474.

211. Parpart (A.K.) et Dzieman (A.J.). — The chemical composition of the red cell membrane. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantit. Biol.*, 1940, 8, 17.

212. Paysant (P.). — Enquête sur la technique de l'électrophorèse des lipoprotéines et sur ses résultats. *Ann. Biol. Clin.*, 1960, 18, 689.

213. Paysant-Diamant (M.) et Polonovski (J.). — Incorporation in vitro du ^{32}P dans les phospholipides globulaires du sang humain. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, 42, 337.

214. Paysant-Diamant (M.) et Polonovski (J.) in Polonovski (J.). — *Biosynthèse des phospholipides. IV^e Journ. Bioch. lat., Genève*, 1961.

215. Peterson (M.L.) et Hirsh (J.). — Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras de globules rouges humains. *J. Lipid. Research*, 1959, 1, 132.

216. Phillips (G.B.). — Isolation of lysolecithin of human serum. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1957, 43, 566.

217. Phillips (G.B.) et Roome (N.S.). — Phospholipids of human red blood cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1959, 100, 489.

218. Picken (L.E.R.). — The fine structure of biological systems. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.*, 1940, 15, 133.

219. Policard (A.) et Baud (C.A.). — Les structures inframicroscopiques normales et pathologiques des cellules et des tissus. *Masson*, Paris, 249.

220. Polonovski (J.) et Douste-Blazy (L.). — Fractionnement des phospholipides plasmatiques. *Biochemical Problems of lipids, Butterworths*, London, 1956, p. 64.

221. Polonovski (J.), Etienne (J.), Paysant (M.) et Petit (M.). — Fractionnement chromatographique des phospholipides plasmatiques. *Ann. Biol. Clin.*, 1959, 17, 186.

222. Polonovski (J.). — Biosynthèse des phospholipides. *IVe Journées biochimiques latines, Genève*, 1961, p. 30.

223. Ponder (E.). — The mammalian red cell and the properties of haemolytic systems. *Protoplasma Monographien, Berlin*, 1934, p. 102.

224. Ponder (E.). — On properties of the red cell ghost. *J. Exp. Biol.* 1942, 18, 257.

225. Ponder (E.). — The paracrystalline state of the rat red cell. *J. Gen. Physiol.*, 1945, 29, 89.

226. Ponder (E.). — Hemolysis and related phenomena. *New-York, Grune et Stratton*. 1948.

227. Ponder (E.). — Observations sur certaines propriétés des stromas de globules rouges. *Rev. Hématol.*, 1950, 5, 580.

228. Ponder (E.). — Fragmentation of red cell ghosts in relation to the problem of red cell structure. *J. Exp. Biol.*, 1951, 28, 567.

229. Ponder (E.). — Certain hemolytic mechanisms in hemolytic anemia. *Blood*, 1951, 6, 559.

230. Ponder (E.). — Transformation en faucilles de fragments de globules rouges ou de fragments de stromas. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, 145, 1665.

230 *bis*. Ponder (E.). — Structure du globule rouge. *Ann. Biol. Clin.*, 1962, 20, 231.

231. Ponder (E.), Bessis (M.), Bricka (M.) et Breton-Gorius (J.). — Modification de la surface des érythrocytes par différentes agressions et particulièrement durant l'agglutination, étudiées au microscope électronique. *Rev. Hémat.*, 1952, 7, 550.

232. Ponder (E.) et Barreto (D.). — Spontaneous shrinking of human red cell ghosts. *Acta Hematol.*, 1954, 12, 393.

233. Ponder (E.). — Present concept of the structure of the mammalian red cell. *Blood*, 1954, 9, 227.

234. Ponder (E.) et Ponder (R.V.). — Propriétés de stromas de globules rouges humains préparés par « hémolyse successive » dans des milieux de force ionique décroissante. *Rev. Hémat.*, 1960, 15, 282.

235. Prankerd (T.A.J.), Altman (K.I.) et Young (L.E.). — Abnormalities of carbohydrate metabolism of red cells in hereditary spherocytosis. *J. Clin. Invest.*, 1954, 23, 957.

236. Prankerd (T.A.J.), Altman (K.I.) et Anderson (J.R.). — Electrophoresis of human red cell stroma. *Nature*, 1954, 18, 1147.

237. Prankerd (T.A.J.). — The metabolism of the human erythrocyte. *Brit. J. of Hematol.*, 1955, 1, 131.

238. Prankerd (T.A.J.). — Red cell structure and metabolism in hemolytic anemia. *Brit. Med. Bull.*, 1959, 15, 54.

239. Radin (N.S.), Brown (J.R.) et Lavin (F.B.). — The preparative isolation of cerebrosides. *J. Biol. Chem.*, 1956, 219, 977.

240. Radin (N.S.). — Glycolipide chromatography. *Feder. Proc.*, 1957, 16, 825.

241. Rapport (M.M.) et Alonzo (N.). — Photometric determination of fatty acid ester groups in phospholipids. *J. Biol. Chem.*, 1955, 217, 193.

242. Rathmann (D.M.). — *Ph. D. Thesis, Rochester*, 1944. In Marinetti (G.V.) et Stotz (E.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1956, 21, 168.

243. Reed (C.F.), Swisher (S.N.), Marinetti (G.V.) et Eden (E.G.). — Studies of the lipids of the erythrocyte. I. - Quantitative analysis of the lipids of normal human red blood cells. *J. Lab. Clin. Invest.*, 1960, 56, 281.

244. Roberti (E.), Delwiche (C.) et Bregoff (H.M.). — *J. Biol Chem.*, 1951, 33, 784. In Paysant-Diamant (M.) et Polonovski (J.), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, 42, 337.

245. Rouhi (A.), Blass (J.) et Polonovski (J.). — Solubilisation des amino-acides dans les extraits lipidiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, 36, 1417.

246. Robshein-Robbin (F.S.) et Whipple (G.H.). — Red cell stroma in dogs stroma proteins and stroma lipids in different types of anemia. *J. Exp. Med.*, 1955, 102, 705.

247. Rouser (G.), Marinetti (G.V.), Witter (R.F.), Berry (J.F.) et Stotz (E.). — Paper chromatography of phospholipids. *J. Biol. Chem.*, 1956, 223, 485.

248. Rowe (C.E.). — Phospholipide metabolism in human erythrocytes. *Biochem. J.*, 1959, 71, I P.

249. Rowe (C.E.). — The biosynthesis of phospholipids by human blood cells. *Biochem. J.*, 1959, 73, 438.

250. Rowe (C.E.). — The phospholipids of human blood plasma and their exchange with the cells. *Biochem. J.*, 1960, 76, 471.

251. Rowe (C.E.), Allison (A.C.) et Lovelock (J.E.). — Lipid biosynthesis in human blood : the incorporation of acetate into lipids of different types of human blood cell. *Bioch. Biophys. Acta*, 1960, 41, 310.

251 *bis*. Salton (M.R.J.). — Polysaccharides in biology. *Springer Editor, New-York.* « *Chemestry of the cell wall* », 1959.

252. Schauer (R.) et Hillmann (G.). — Beitrâge zum mechanismes des phosphat-transports in erythrocytes des menschen. *Z. Physiol. Chem.*, 1961, 325, 934.

252 *bis*. Smith (E.B.). — Examination by paper chromatography of the different phospholipids in serum lipoprotein fractions and in atheromatous aorta. *Biochemistry of lipids, Pergamon Press, London*, 1960, p. 147.

253. Schmitt (F.O.), Bear (R.S.) et Ponder (E.). — The red cell envelope considered as wiener mixed hady. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1938, 11, 309.

254. Schmidt (F.O.) et Palmer (K.J.). — *Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol.*, 1940, 8.

255. Schmidt (L.H.). — Nature of difference in phospholipid content of oxalated and heparinized plasma. *J. Biol. Chem.*, 1935, 109, 449.

256. Schmidt (G.), Benotti (J.), Hershman (B.) et Tanhauser (S.J.). — A micromethod for the quantitative partition of phospholipide

mixtures into monoamino-phospholipide and sphingomyelin. *J. Biol. Chem.*, 1946, 166, 505.

257. Scholfield (C.), Mac Guire (T.) et Dutton (F.). — *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1950, 27, 352. In Douste-Blazy (L.), *Thèse de Sciences, Toulouse*, 1955.

258. Shinowara (G.Y.). — Thromboplastic cell component, the lipoprotein of erythrocytes and platelets. *J. Biol. Chem.*, 1957, 225, 63.

259. Sinclair (R.G.). — Blood phospholipid as transport mechanism. *J. Biol. Chem.*, 1936, 115, 211.

260. Sinclair (R.G.) et Dolan (M.). — The so-called ether-insoluble phospholipids in blood and tissues. *J. Biol. Chem.*, 1942, 142, 659.

261. Solomon (A.K.), Lionetti (F.) et Curran (P.F.). — Possible cation carrier substance in blood. *Nature*, 1956, 178, 582.

262. Sperry (W.). — Microdetermination of phosphorus in lipide extracts. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1942, 14, 88.

263. Stern (K.G.), Reiner (M.) et Silber (R.M.). — On the electrophoretic pattern of red blood cell proteins. *J. Biol. Chem.*, 1945, 161, 731.

264. Swahn (B.). — Method for localization and determination of serum lipids after electrophoretical separation on filter paper. *Scandin. J. Clin. Lab. Invest.*, 1953, 4, 98.

265. Tatibana (M.), Miyamoto (K), Odaka (T.) et Nakao (M.). — Phosphorus metabolism in human erythrocyte. V. - Incorporation of ^{32}P during very short time intervals. *J. Biochem.* (Japon), 1960, 48, 685.

266. Tishkoff (G.M.), Robsheit-Robbin (F.S.) et Whipple (G.M.). — Red cell stroma in dogs. Variation in the stroma protein and lipid fractions related to experimental condition. *Blood*, 1953, 8, 459.

267. Thanhauser (S.J.), Benotti (J.) et Reinstein (F.). — Studies on animal lipids determination of lecithin, cephalin and sphingomyelin in body fluids and tissues with analyses of normal human sera. *J. Biol. Chem.*, 1939, 129, 709.

268. Thanhauser (S.J.) et Boncoddo (N.F.). — Isolation and identification of hydrolecithin (dipalmitylllecithin) from brain and spleen. *J. Biol. Chem.*, 1948, 172, 135.

269. Trappe (W.). — Trennung v. biol. Fettstoffen aus ihren natürlichen durch Anwend. v. Adsorptionssäulen. I. Mitt, eluotrope Reihe d. lösungsmittel. *Biochem. Z.*, 1940, 305, 150.

270. Trappe (W.). — Trennung v. biol. Fettstoffen aus ihren natürlichen durch Anwend. v. Adsorptionssäulen. 2. Mitt. Abtrenn. d. P. u. N. freien Lipoidfractionen. *Biochem. Z.*, 1940, 306, 316.

271. Trappe (W.). — Trennung v. biol. Fettstoffen aus ihren natürlichen durch Anwend. v. Adsorptionssäulen. 3. Mitt. Dass. *Biochem. Z.*, 1940, 307, 97.

272. Tsuda (S.). — Hemoglobin synthesis in erythroid cells, morphologic and cytochem. study. *Okayama Igakkai Zasshi*, 1959, 71, 1009.

273. Turner (J.C.). — Absence of lecithin from the stromata of the red cells of certain animals (ruminants) and its relation to venom hemolysis. *J. Exp. Med.*, 1957, 105, 189.

274. Turner (J.C.), Anderson (H.M.) et Gandal (C.P.). — Species differences in red blood cell phosphatides separated by column and paper chromatography. *Bioch. Biophys. Acta*, 1958, 30, 130.

275. Uzmann (L.L.). — General method for preparation of cerebrosides. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1953, 45, 148.

276. Vacca (J.B.), Waring (P.P.) et Nims (R.M.). — Glyceride content of human and canine red blood cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1960, 105, 100.

277. Valdiguié (P.) et Douste-Blazy (L.). — Sur la présence et la nature d'un constituant hémolytique dans le sérum humain. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, 39, 1109.

278. Valdiguié (P.), Henry (L.), Mathis (R.) et Douste-Blazy (L.). — Contribution à l'étude des sérolécithines et des ovolécithines par distribution à contre-courant et par spectrographie infra-rouge. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, 42, 1035.

280. Waitz (R.). — Sur certaines formations particulières observées dans le sang et provenant des hématies. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 121, 444.

281. Waitz (R.). — Le phénomène d'expulsion de substance hors des hématies (hématexodies) ; son étude expérimentale. *Ann. Méd.*, 1936, 40, 413.

282. Waitz (R.). — L'hématexodie, processus de désintégration de l'hématie, avec projection d'un film de microcinématographie. *Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1936, 52, 1663.

283. Warburg (O.). — *Zur Biologie der roten bultzellen Hoppe Seyl. Z.*, 1904, 59, 112.

284. Warburg (O.) et Christian (W.). — Aktivierung von Kahlehydrat in roten Blutzellen. *Biochem. Z.*, 1931, 238, 131.

285. Waugh (D.F.) et Schmitt (F.O.). — Investigations of the thickness and ultrastructure of cellular membranes by the analytical leptoscope. *Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol.* 1940, 8, 233.

286. Webb (J.P.W.), Allison (A.C.) et James (A.T.). — In vitro lipid synthesis in fowl blood. *Bioch. Biophys. Acta*, 1960, 40, 89.

287. Wendel (W.B.). — Oxidation of lactic acid by dog erythrocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1929, 26, 865.

288. Wiegerhausen (B.). — Hexadecylsufonat hämolyse und erythrocytenstruktur. *Inauguraldissertation*, Berlin, 1953, p. 429.

289. Wolpers (C.). — Electron microscopic studies on non nucleated erythrocytes, reticulocytes and pseudoreticulocytes. *Klin. Woch.*, 1956, 34, 61.

290. Yamakawa (T.), Irie (R.) et Iwanaga (M.). — The chemistry of lipids of posthemolytic residue or stroma of erythrocytes. IX. - Silicic acid chromatography of mammalian stroma glycolipids. *J. Biochem.* (Japon), 1950, 48, 490.

291. Yamakawa (T.) et Suzuki (S.). — The chemistry of the lipids of posthemolytic residue or stroma of erythrocytes. I. - The ether-insoluble lipides of lyophilized horse blood stroma. *J. Biochem.* (Japon), 1951, 38, 199.

292. Yamakawa (T.) et Suzuki (S.). — The chemistry of the lipids of posthemolytic residue or stroma of erythrocytes. II. - The structure of hemataminic acid. *J. Biochem.* (Japon), 1952, 39, 173.

293. Yamakawa (T.) et Iida (T.). — Immunochem. study on red blood cells. I. - Globoside as the agglutinogen of A, B, O system of erythrocytes. *Jap. J. Exp. Med.*, 1953, 23, 327.

294. Yamakawa (T) et Suzuki (S.). — The chemistry of lipids of posthemolytic residue or stroma of erythrocytes. Distribution of hexosamine and hemataminic acid in red blood corpuscles of various species of animals. *J. Biochem.* (Japon), 1953, 40, 7.

295. Yamakawa (T.), Suzuki (S.) et Hattori. — The chemistry of the lipids of posthemolytic residue or stroma of erythrocytes. Glycolipids of erythrocytes stroma and gangliosides. *J. Biochem.* (Japon), 1953, 40, 611.

296. Yamakawa (T.). — The sialic acids of blood cells and serum. *J. Biochem.* (Japon), 1956, 43, 867.

297. Yamakawa (T.), Matsumoto (M.), Suzuki (S.) et Iida (T.). — The chemistry of the lipids of posthemolytic residue or stroma of erythrocytes. VI. - Sphingolipids of erythrocytes with respect to blood group activities. *J. Biochem.* (Japon), 1956, 43, 41.

298. Yamakawa (T.), Matsumoto (M.), Suzuki (S.) et Iida (T.). — Red cell glycolipids as A, B, O blood group antigen. *Proceedings of the intern. genetics sympos.*, 1956, Nankodo, Tokyo, p. 616.

299. Yamakawa (T.), Ohta (R.), Ichikawa (Y) et Osaki (J.). — Purification du facteur déterminant le groupe sanguin de type A, B, O. *C.R. Soc. Biol.*, 1958, 152, 1288.

300. Yamakawa (T.) et Irié (R.). — On the mucolipid nature of A, B, O, group substance of erythrocytes. *J. Biochem.* (Japon), 1960, 48,. 919.

300 *bis*. Yoshida (H.) et Nukada (T.). — *Bioch. Biophys. Acta*, 1951, 46, 408. In Polonowski (J.). *Biosynthèse des phospholipides. IV*e *Journées biochimiques Latines*, Genève, 1961.

301. Yoshikawa (H.), Nakao (H.), Miyamoto (K.) et Yanagisawa (I.). — Effect of inosine and adenine on adenosinetriphosphate regeneration and morphology of long-stored erythrocytes. *J. Biochem.* (Japon), 1959, 47, 11.

302. Yasuda (M.). — The determination of the iodine number of lipids. *J. Biol. Chem.*, 1931, 94, 401.

302 *bis*. Yasuda (M.). — Microdetermination of the iodine number of sterols in the tissues with special reference to ergosterol. *J. Biochem.* (Japon), 1947, 24, 417.

303. Zilversmit (D.B.), Entenman (C.), Fishler (M.C.) et Chaikoff (I.L.). — The turnover rate of phospholipids in the plasma of the dog as measured with radioactive phosphorus. *J. Gen. Physiol.*, 1943. 26, 333.

304. Zilversmit (D.B.). — Standard methods of clinical chemestry. *Acad. Press. New-York*, 1958, II, p. 132.

305. Zilversmit (D.B.), Davis (A.K.). — Microdetermination of plasma phospholipids by trichloracetic acid precipitation. *J. Lab. Clin. Med.*, 1950, 35, 155.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 6

PREMIÈRE PARTIE :

LE STROMA GLOBULAIRE

1. CONSTITUTION :

A - Chimique 7
1. Lipides 8
2. Protéines 20
3. Enzymes 21
4. Glucides 22

B - Physique 22

2. PROPRIÉTÉS :

A - Perméabilité et pénétration des substances 32

B - Propriétés électrophorétiques 33

3. MÉTABOLISME DES LIPIDES GLOBULAIRES :

A - Physiologique 36
1. Biosynthèse des acides gras 38
2. Biosynthèse du cholestérol 39
3. Biosynthèse des phospholipides . . 40
4. Echange des lipides entre hématies et plasma 44

B - Pathologique 46
1. Sphérocytose 48
2. Sicklanémie 51
3. Acanthocytose 52

4. Rôle des lipides globulaires :

A - Propriétés immunochimiques 52
B - Rôle dans l'hémolyse 55
C - Rôle dans le transport des ions 60

Deuxième Partie :

RECHERCHES PERSONNELLES

1. Méthodes d'analyse :

A - Méthodes d'extraction des lipides 64
B - Purification des extraits lipidiques :
1. Dialyse et électrodialyse 67
2. Purification selon Folch 68
C - Méthodes d'analyse proprement dites :
1. Physiques :
a) Isolement des lipides :
— par l'acétone 69
— sur colonne d'acide silicique 70
b) Différentes méthodes utilisées :
— Chromatographie sur papier à contre courant 71
— Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique . . 80
— Chromatographie sur colonne 87
1. Fractionnement des phospholipides 88
2. Fractionnement des lipides non phosphorés 89
3. Séparation du cholestérol et des esters 90
— Distribution à contre-courant 91
— Electrophorèse sur papier . . 96
— Spectrographie infra-rouge . . 97
2. Chimiques :
— Dosage du phosphore 98
— Dosage des esters d'acides gras 98

— Dosage du cholestérol 99
— Détermination de l'indice d'iode 99
— Dosage des acétates phosphatides 99
— Dosage des bases azotées .. 99

2. Résultats :

— *Hématies Normales :*

A - Chromatographie sur papier à contre-courant 102
1. Préparation de l'extrait 103
2. Chromatographie de l'extrait lipidique total 104
3. Chromatographie de l'extrait acétonique 104
4. Chromatographie de l'insoluble acétonique 105

B - Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique 106
1. Lipides totaux 107
2. Lipides non phosphorés 110

C - Chromatographie sur colonne d'acide silicique 112
1. Phospholipides 114
2. Lipides non phosphorés 117

D - Chromatographie sur colonne d'alumine 122
E - Distribution à contre-courant 123
F - Electrophorèse des lipoprotéines globulaires 132
G - Lipides globulaires au cours de l'hémolyse hypotonique « in vitro » 133

— *Hématies Falciformes :*

A - Dosages chimiques 139
B - Electrophorèse des stromas 139
C - Chromatographie des éluats d'électrophorèse 141
D - Chromatographie sur colonne d'acide silicique 142

Conclusion 145